

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



10/509247



(43) 国際公開日  
2003 年 10 月 9 日 (09.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 03/082345 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: A61K 48/00, 45/00, 9/51,  
9/08, 38/18, 38/21, A61P 1/16, 35/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP03/02602

(22) 国際出願日: 2003 年 3 月 5 日 (05.03.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願2002-97280 2002 年 3 月 29 日 (29.03.2002) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 科学技術  
振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY  
CORPORATION) [JP/JP]: 〒332-0012 埼玉県 川口市  
本町四丁目1番8号 Saitama (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてののみ): 黒田 俊一  
(KURODA, Shunichi) [JP/JP]: 〒565-0872 大阪府 吹  
田市 上山田 7 番 C-1 0 4 号 Osaka (JP). 谷澤 克  
行 (TANIZAWA, Katsuyuki) [JP/JP]: 〒563-0214 大阪  
府 豊能郡 豊能町 希望ヶ丘 2-3 0-2 Osaka (JP).

近藤 昭彦 (KONDO, Akihiko) [JP/JP]: 〒657-0015 兵  
庫県 神戸市 灘区 篠原 伯母野山町 1-2-8 0 6  
Hyogo (JP). 上田 政和 (UEDA, Masakazu) [JP/JP]: 〒  
162-0837 東京都 新宿区 納戸町 6 Tokyo (JP). 妹尾 昌  
治 (SENO, Masaharu) [JP/JP]: 〒703-8273 岡山県 岡山  
市 門田文化町 2-1 0-1 3 Okayama (JP). 多田 宏子  
(TADA, Hiroko) [JP/JP]: 〒700-0016 岡山県 岡山市 伊  
島町 2-2 0-2 2-2 0 6 Okayama (JP).

(74) 代理人: 原 謙三 (HARA, Kenzo): 〒530-0041 大阪府 大  
阪市 北区 天神橋 2 丁目 北 2 番 6 号 大和南森町ビル  
原謙三国際特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国 (国内): KR, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY,  
CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DRUGS COMPRISING PROTEIN FORMING HOLLOW NANOPARTICLES AND THERAPEUTIC SUBSTANCE  
TO BE TRANSFERRED INTO CELLS FUSED THEREWITH

(54) 発明の名称: 中空ナノ粒子を形成するタンパク質に疾患治療用の細胞導入物質を融合させた薬剤

(57) Abstract: It is intended to provide drugs for treating diseases specifically acting on target cells or tissues with the use of hollow protein nanoparticles, wherein a protein drug can be efficiently encapsulated in the particles, and a treatment method with the use of these drugs. These drugs comprise hollow protein nanoparticles made of a protein, which is capable of recognizing specific cells such as liver cells and forming particles (for example, hepatitis B virus surface antigen protein), and a therapeutic substance to be transferred into cells (for example, an interferon, a liver cell growth factor, etc.) fused with the protein.

(57) 要約: タンパク質中空ナノ粒子を用いた目的の細胞や組織に特異的に作用する疾患治療用薬剤であって、粒子内部にタンパク質薬剤を効率よく包含させることができる薬剤、およびこの薬剤を用いた治療方法を提供する。肝細胞などの特定の細胞に対する認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質 (たとえば、B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質) からなる中空ナノ粒子において、当該タンパク質に疾患治療用の細胞導入物質 (たとえばインターフェロンまたは肝細胞成長因子など) が融合されてなる薬剤である。

WO 03/082345 A1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 明 細 書

中空ナノ粒子を形成するタンパク質に疾患治療用の細胞導入物質を融合させた薬剤

## 技術分野

- 5 本発明は、中空ナノ粒子を形成するタンパク質に疾患治療用の細胞導入物質が融合されてなる薬剤に関し、より詳細には、粒子内部に疾患治療用の細胞導入物質を包含し、この細胞導入物質を特定細胞または組織内に特異的に導入可能な薬剤に関するものである。

## 10 背景技術

- 近年、医学の分野において、患部に直接作用し、高い効果を示す副作用の少ない薬品の開発が盛んに行われている。特に、ドラッグデリバリーシステム（DDS）と呼ばれる方法は、目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的に薬剤等の有効成分を運搬し、目的箇所では有効成分を作用させることのできる方法として注目されている。

- 15 目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的に薬剤となるタンパク質を送り込む方法としては、従来、当該タンパク質をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクターをエレクトロポレーション法等により目的細胞に導入して、この遺伝子を細胞内で発現させることによりタンパク質薬剤を細胞内に送り込むいわゆる遺伝子導入方法が開発されてきた。
- 20 しかし、このような従来の遺伝子導入方法は、いずれも、目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的にタンパク質薬剤を送り込む方法とし

ては不十分なものであった。他方、薬剤となるタンパク質を直接的に目的細胞、あるいは、目的組織に送り込む方法については、未だ有効な方法が開発されていないのが現状である。

以上のような状況に鑑み、本発明者らは、国際公開番号W O 0 1 / 6 4 9 3 0の国際出願（公開日：2 0 0 1年9月7日、以下、「国際出願W O 0 1 / 6 4 9 3 0」という）において、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が導入された中空ナノ粒子を用いて、目的とする細胞や組織に、物質（遺伝子、タンパク質、化合物等）を特異的かつ安全に運搬、導入するための方法を提案しているが、この方法を応用しつつ目的細胞または組織に対して特異的に送り込むことができるタンパク質薬剤の開発等が以下のような問題を克服する上からも更なる課題となっていた。

従来、タンパク質薬剤を、目的とする細胞や組織に特異的かつ安全に運搬、導入することが困難であったため、タンパク質薬剤を用いた治療は患者に大きな負担を与えていた。

例えば、ウィルス性肝炎（特にC型肝炎）の治療には、静脈注射により、タンパク質薬剤であるインターフェロンを長期間全身投与する方法をとっている。この方法は、高い治療効果が認められるものの、患部以外にもインターフェロンが作用するため、投与のたびに高熱、脱毛、虚脱感、免疫反応などの副作用がおきるという問題を有している。

また、肝細胞成長因子は肝硬変治療に有効であることが分かっているが、静脈注射で全身投与すると、予測できない副作用が起こる可能性があるので、カテーテルにより肝臓に直接投与する方法を採用している。しかし、カテーテルによる投与のためには、手術が必要であり、長期間

の治療では患者に負担がかかっていた。

本発明は、上記の課題に鑑みなされたものであり、その目的は、タンパク質中空ナノ粒子を用いた目的の細胞や組織に特異的に作用する疾患治療用薬剤であって、粒子内部にタンパク質薬剤を効率よく包含させることができる薬剤、およびこの薬剤を用いた治療方法を提供することにある。

#### 発明の開示

本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、粒子を形成するタンパク質と、疾患治療用のタンパク質薬剤（細胞導入物質）とが融合されたタンパク質を発現するベクターを作製し、このベクターを用いて薬剤となる粒子を製造することにより、粒子内部にタンパク質薬剤を効率よく包含させることができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

即ち、本発明に係る薬剤は、特定の細胞（たとえば肝細胞など）に対する認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質からなる中空ナノ粒子において、当該タンパク質に疾患治療用の細胞導入物質が融合される薬剤である。

上記「粒子形成能を有するタンパク質」としては、たとえばB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質を挙げることができる。このタンパク質は、真核細胞で発現させると、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出される。本発明の薬剤は、このような粒子形成能を有するタンパク質をコードする遺伝子と、その下流側に上記細胞導入物質（換言すれば、タンパク質薬剤）をコードする遺伝子とを含むベクターによって真核細胞（たとえば哺乳類等の動物細胞、酵母または昆

虫細胞)を形質転換させ、当該真核細胞に遺伝子発現させることにより、当該タンパク質に細胞導入物質を融合させたかたちで粒子として製造することができる。

このように、粒子を形成するタンパク質に疾患治療用の細胞導入物質が融合したかたちで粒子が形成されるので、粒子形成の際、あわせて粒子内部に細胞導入物質を包含させることができ、粒子形成後に後工程で粒子内部に細胞導入物質を導入するといった工程が不要になり、薬剤の製造が容易になる。さらに、粒子形成後に粒子内部に導入することが困難な巨大分子等でも、粒子内部に効率よく包含させることが可能になる。

上記B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質を用いて形成された粒子は、肝細胞を認識し、肝細胞に対して特異的に粒子内の物質を運搬することができるので、肝臓疾患治療用の物質(タンパク質薬剤)を包含させることにより、肝細胞に対して特異的かつ効果的に作用する有効な治療薬となる。この場合、粒子内部に包含させる物質としては、たとえばインターフェロン(IFN)または肝細胞成長因子(HGF)等のタンパク質薬剤を挙げることができる。IFNは、ウィルス性肝炎の治療薬として用いられており、HGFは肝硬変に冒された肝臓を再生させる効果がある。これらを粒子内部に包含させることで、肝細胞特異的に導入することができる、有効で副作用の少ない肝炎治療または肝硬変治療を行うことができる。

また、たとえば上記B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質を、本来の肝細胞に対する感染能を欠失するように改変し、さらに増殖因子や抗体を提示するように改変し、このように改変されたB型肝炎ウィルス表面

抗原タンパク質を用いて粒子を形成することで、肝細胞以外の特定の細胞に対して特異的に粒子内の物質を運搬することができる。たとえば、ある癌細胞を特異的に認識する抗体を提示させることで、その癌細胞を認識し、その癌細胞に対して特異的に粒子内の物質を運搬することができる。

本発明の薬剤は、静脈注射という簡便な方法で特定の細胞または組織における疾患を効果的に治療することができ、従来の治療方法と大きく異なり、多量の薬剤の投与あるいは遺伝子治療等における外科手術を必要とせず、副作用の心配も極めて低く、そのまま臨床応用可能なものである。

本発明の治療方法は、本発明の薬剤を投与することによる疾患の治療方法である。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、本発明の薬剤を構成する粒子の概略模式図であって、粒子を形成する H B s A g L タンパク質にタンパク質薬剤が融合された状態を示す図である。

図 2 は、本発明の実施例における H B s A g L タンパク質遺伝子の各タンパク質領域を表す概略模式図である。1 ～ 8 は、表面抗原における各部位の働きを示している。

図 3 は、本発明の実施例における遺伝子組換え酵母を用いた H B s A g L タンパク質粒子の発現および精製操作を例示した概略説明図である。なお、(a) は遺伝子組換え酵母の作成、(b) は H i g h - P i 培地における培養、(c) は 8 S 5 N - P 4 0 0 培地における培養、(d)

）は破碎、（e）は密度勾配遠心分離、（f）はHBsAg Lタンパク質粒子をそれぞれ示す。

図4は、本発明の実施例における、HBsAg Lタンパク質とEGFPとの融合タンパク質を発現するプラスミドの作製方法を説明する図である。

図5は、本発明の実施例において、HBsAg Lタンパク質とEGFPとの融合タンパク質によってEGFPを導入したヒト肝癌細胞HepG2が、共焦点レーザー蛍光顕微鏡によって観察された様子を示す図である。

図6は、本発明の実施例において、HBsAg Lタンパク質とEGFPとの融合タンパク質によってEGFPを導入したヒト扁平上皮癌由来細胞A431が、共焦点レーザー蛍光顕微鏡によって観察された様子を示す図である。

図7は、本発明の実施例において、HBsAg Lタンパク質とEGFPとの融合タンパク質を静脈注射した、ヒト肝癌由来HuH-7細胞を移植された胆癌マウスの腫瘍部が、共焦点レーザー蛍光顕微鏡によって観察された様子を示す図である。

図8は、本発明の実施例において、HBsAg Lタンパク質とEGFPとの融合タンパク質を静脈注射した、ヒト大腸癌由来WiDr細胞を移植された胆癌マウスの腫瘍部が、共焦点レーザー蛍光顕微鏡によって観察された様子を示す図である。

図9は、物質運搬体に内包される細胞導入物質を例示した表である。

図10は、物質運搬体に内包される細胞導入物質を例示した表であり、図9の続きとなるものである。



図 1 1 は、物質運搬体に内包される細胞導入物質を例示した表であり、図 1 0 の続きとなるものである。

#### 発明を実施する為の最良の形態

5       本発明の薬剤を構成する中空ナノ粒子は、粒子形成能を有するタンパク質に細胞導入物質が融合されてなるものであるが、その粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子（換言すれば、特定の細胞を認識する分子）を導入することによって、目的細胞あるいは目的組織に特異的に物質を運搬することができる。このような粒子形成能を有するタンパク

10       質としては、種々のウィルスから得られるサブウィルス粒子を適用することができる。具体的には、B型肝炎ウィルス（Hepatitis B Virus: HBV）表面抗原タンパク質等が例示される。

      また、このような粒子形成能を有するタンパク質からなるタンパク質粒子としては、真核細胞でタンパク質を発現させることにより得られる

15       ものが挙げられる。つまり、真核細胞で粒子形成能を有するタンパク質を発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出されるのである。このとき、真核細胞としては、哺乳類等の動物細胞、酵母、昆虫細胞等が適用できる。

      本発明者らは、後述の実施例に示すとおり、遺伝子組換え酵母で上記

20       HBV表面抗原Lタンパク質を発現させることにより、発現されたHBV表面抗原Lタンパク質から酵母由来の脂質二重膜に多数の同タンパク質が埋め込まれた短径約20nm、長径約150nmの楕円状中空粒子が形成されることを見出し、報告している（J. Biol. Chem., Vol. 267, No. 3, 1953-1961, 1992）。このような粒子は、HBVゲノムを全く含

まないので、ウィルスとしては機能せず、人体への安全性が極めて高い。また、HBVの肝細胞への極めて高い感染力を担う肝細胞特異的レセプターを粒子表面に提示しているため、肝細胞に対して特異的に物質を運搬する運搬体としての効果も高いのである。

5       このように遺伝子組換え酵母を用いてタンパク質粒子を形成する方法は、菌体内の可溶性タンパク質から高効率で粒子が生産される点で好適である。

10       一方、昆虫細胞は、酵母よりも高等動物に近い真核細胞であるといえ、酵母では再現しきれない糖鎖等の高次構造をも再現できる点で異種タンパク質の大量生産において好ましい方法といえる。従来の昆虫細胞の系はバキュロウイルスを用いた系で、ウィルス発現を伴うものであったために、タンパク質発現に際して細胞が死滅したり溶解したりした。その結果、タンパク質発現を連続的に行ったり、死滅細胞から遊離したプロテアーゼによりタンパク質が分解したりするという問題があった。また、  
15       タンパク質を分泌発現させる場合には、培地中に含まれる大量の牛胎仔血清が混入することで、折角培地中に分泌されても精製が困難であった。しかし、最近になって、バキュロウイルスを介さない昆虫細胞系で、無血清培養可能なものがInvitrogen社により開発され、市販されている。従って、このような昆虫細胞を用いれば、精製が容易で高次構造  
20       をも再現されたタンパク質粒子が得られる。

      本発明のタンパク質中空ナノ粒子では、以上のような種々の方法によって得られた粒子表面のレセプターを任意の生体認識分子に改変することにより、肝細胞以外にも、任意の細胞及び組織に極めて高い特異性で物質を運搬、導入することが可能となる。

もちろん、粒子形成能を有するタンパク質は、上記の B 型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質に限られるものではなく、粒子を形成することができるタンパク質であれば、どのようなものでもよく、動物細胞、植物細胞、ウィルス、菌類等に由来する天然タンパク質や、種々の合成タンパク質等が考慮される。また、例えばウィルス由来の抗原タンパク質等が生体内において抗体を惹起する可能性がある場合などは、改変して抗原性を減少させたものを粒子形成能を有するタンパク質として用いてもよい。例えば、粒子形成能を有するタンパク質としては、国際出願 WO 01 / 64930 に開示される抗原性を減少させた B 型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質であってもよいし、同国際出願に開示されるその他の改変型タンパク質（B 型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質を、遺伝子操作技術を用いて改変したタンパク質）であってもよい。また、B 型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質や同タンパク質を改変した改変型タンパク質に、さらに増殖因子や抗体などの他のタンパク質を付加したものを、粒子形成能を有するタンパク質として用いてもよい。

粒子形成能を有するタンパク質に導入される生体認識分子（粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が含まれる場合と、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子を融合（または直接間接に結合）させる場合とを両方含む）としては、たとえば成長因子、サイトカイン等の細胞機能調節分子、細胞表面抗原、組織特異的抗原、レセプターなどの細胞および組織を識別するための分子、ウィルスおよび微生物に由来する分子、抗体、糖鎖、脂質などが好ましく用いられる。具体的には、癌細胞に特異的に現れる EGF 受容体や IL-2 受容体に対する抗体や EGF、また HBV の提示するレセプターも含まれる。これらは、目的と

する細胞、あるいは組織に応じて適宜選択される。なお、ここで「生体認識分子」とは、特定の細胞を認識する分子（換言すれば、特定の細胞に対する認識能を本発明の薬剤に付与する分子）のことをいう。

本発明では、以上のとおりのタンパク質中空ナノ粒子を、粒子形成能を有するタンパク質に、目的細胞または目的組織に導入したい物質（細胞導入物質）を融合させたかたちで形成することによって、特定の細胞に対して特異性を有する物質運搬体が得られる。この物質運搬体に内包される細胞導入物質としては、前述のように、インターフェロン（ $IFN\alpha$ 、 $IFN\beta$ 、 $IFN\omega$  など）または肝細胞成長因子（ $HGF$ ）等のタンパク質薬剤（ペプチドを含む）を挙げることができ、さらに図9ないし図11に示す物質を挙げることができる。

粒子形成能を有するタンパク質に細胞導入物質を融合させる方法としては、後述の実施例に示すとおり、例えば、B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質をコードする遺伝子と、その下流側に上記タンパク質薬剤をコードする遺伝子とが挿入されたプラスミドを作製し、このプラスミドを用いて真核細胞に粒子を形成させることによって、粒子を形成するB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質にタンパク質薬剤が融合した本発明の薬剤を製造することができる（図1参照）。

以上のように作製された本発明の薬剤は、特定の細胞に対して特異的に薬剤を送り込むものとして有用である。例えば、本発明の薬剤として、 $IFN$ が融合したB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質からなる粒子を静脈注射などによって体内に投与すれば、当該粒子は体内を循環し、粒子表面に提示した肝細胞特異的レセプターにより肝細胞に導かれ、感染する。そして、 $IFN$ が肝細胞中に送り込まれ、 $IFN$ の肝臓組織特

異的な導入が行われる。なお、薬剤の投与方法としては、静脈注射による投与のほかに、経口投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮下投与等が挙げられる。

5 従来、インターフェロン、インターロイキンなどのタンパク質薬剤は、副作用が強く、全身投与を行うと患者の負担となるため、目的の細胞や組織に対してのみ特異的に薬剤を送り込む必要があった。本発明の薬剤は、上述のように、特定の細胞や組織に対して選択的に薬剤を送り込むことができるので、副作用の強い薬剤でも患者に負担をかけずに効果的に治療を行うことができる。

10 このように、本発明の薬剤を用いれば、in vivoあるいはin vitroで細胞、または組織に特異的に物質を導入することができ、特定細胞または組織に物質を導入することを各種疾患の治療法あるいは治療法の1ステップとして行うことも可能になるのである。

15 以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

#### 〔実施例〕

20 以下の実施例において、HBsAgとは、B型肝炎ウイルス表面抗原(Hepatitis B virus surface Antigen)を示す。HBsAgは、HBVの外被タンパク質であり、図2の模式図に示すように、HBsAgには、Sタンパク質、Mタンパク質、Lタンパク質の3種類がある。このうち、Sタンパク質は、3種のタンパク質に共通した、重要な外被タンパク質であり、Mタンパク質は、Sタンパク質のN末端側に55アミノ

酸 (pre-S2 peptide) が付加したものである。また、Lタンパク質は、Mタンパク質のN末端側に、108もしくは119アミノ酸 (pre-S1 peptide) が付加したものである。

HBsAg Lタンパク質のPre-S領域 (pre-S1, pre-S2) は、HBV  
5 が肝細胞を認識して結合する際に、それぞれ重要な役割を担うことが知られている。Pre-S1は、肝細胞に直接結合する部位を持ち、pre-S2は、血中の重合アルブミンを介して肝細胞に結合する重合アルブミンレセプターを有するのである。

真核細胞でHBsAgを発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上  
10 に膜タンパク質として発現、蓄積される。HBsAgのLタンパク質は、分子間で凝集を起こし、小胞体膜を取り込みながら、出芽様式でルーメン側に粒子として放出される。

以下の実施例では、HBsAgのLタンパク質を用いた。また、図3  
15 に以下の実施例に記載されるHBsAg粒子の発現および精製操作の概略説明図を示した。

(実施例A) 遺伝子組換え酵母によるHBsAg粒子の発現

本発明者らによって報告されたJ. Biol. Chem., Vol. 267, No. 3, 1953-  
1961, 1992記載の方法に基づいて、pGLDLIIP39-RcTを保持  
した遺伝子組換え酵母 (Saccharomyces Cerevisiae AH22R<sup>-</sup>株) を、合  
20 成培地High-Piおよび8S5N-P400中で培養し、HBsAg Lタンパク質  
粒子を発現させた。(図3(a)~(c))

定常成長期 (約72時間後) にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical Co. 製) を用いて、whole cell extractを準備し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミ

ドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を用いて分離して、銀染色によって試料中の HBsAg の同定を行った。

これより、HBsAg は分子量約 52 kDa のタンパク質であることが明らかとなった。

5 (実施例 B) HBsAg 粒子の遺伝子組換え酵母からの精製

(1) 合成培地 8S5N-P400 で培養された遺伝子組換え酵母 (湿重量 26 g) を buffer A 溶液 (7.5 M 尿素、0.1 M リン酸ナトリウム、pH 7.2、1.5 mM EDTA、2 mM PMSF、0.1% Tween 80) 100 ml に懸濁し、グラスビーズを用いてビード  
10 ビーター (BEAD-BEATER) にて酵母を破碎した。破碎後、上清を遠心分離により回収した。(図 3 (c)、(d))

(2) 次に、上清を 0.75 倍容の 33% (w/w) PEG 6000 と混合し、30 分間氷冷した。その後、遠心分離 (7000 rpm、30 分間) を行い、ペレットを回収した。同ペレットは、Tween 80  
15 を含まない buffer A 溶液中で再懸濁した。

(3) 再懸濁した液を、10~40% の勾配をかけた CsCl に重層し、28000 rpm、16 時間の超遠心分離を行った。遠心分離後の試料を 12 画分に分け、ウェスタンブロット法 (Western Blotting) (1 次抗体は、anti-HBsAg モノクローナル抗体) により HBsAg  
20 Ag を含む画分を同定した。さらに、HBsAg を含む画分を Tween 80 を含まない buffer A 溶液で透析した。

(4) (3) で得られた透析液 (12 ml) を 5~50% の勾配をかけたショ糖に重層し、28000 rpm、16 時間の超遠心分離を行った。遠心分離後、(3) と同様に、HBsAg を含む画分を同定し、H

B s A g を含む画分を尿素と T w e e n 8 0 は含まず、代わりに 0 . 8  
5 % の N a C l を含む buffer A 溶液で透析した。 ( ( 2 ) ~ ( 4 ) : 図  
3 ( e ) )

( 5 ) ( 4 ) と同様の操作を繰り返し、透析後の試料をウルトラフィ  
5 ルター ( Ultra Filter ) Q 2 0 0 0 ( アドバンテック社製 ) を用いて  
濃縮し、使用する時まで 4 ° C にて冷蔵保存した。 ( 図 3 ( f ) )

C s C l 平衡遠心分離後のウェスタンブロット ( 3 ) の結果から、H  
B s A g は、分子量 5 2 k D a で S 抗原性を有するタンパク質であるこ  
とが分かった。最終的に、培地 2 . 5 L 由来、湿重量 2 6 g の菌体から  
10 、約 2 4 m g の精製 H B s A g 粒子を得た。

一連の精製過程における画分を銀染色 S D S - P A G E で解析した。  
また、精製により酵母由来のプロテアーゼが除去されていることを確認  
するために、( 5 ) で得られた H B s A g 粒子を 3 7 ° C で 1 2 時間イン  
キュベートした後、S D S - P A G E を行い、銀染色により同定を行っ  
15 た。

その結果、酵母由来のプロテアーゼは、一連の精製過程において完全  
に除去されていることが確認された。

( 実施例 C ) H B s A g に E G F P が融合した粒子の作製

( 1 ) E G F P と H B s A g との融合タンパク質を発現するプラスミド  
20 の作製 ( 図 4 参照 )

前述の H B s A g 発現プラスミド p G L D L I I P 3 9 - R c T を XhoI  
および AccI により切断することで、ニワトリリゾチーム分泌シグナルに  
融合された H B V s A g L タンパク質をコードする遺伝子断片 ( 以下、  
H B s A g 遺伝子と称する ) が切り出される。このとき、H B s A g 遺



伝子の上流側がXhoIに切断され、下流側がAccIに切断される。

一方、プラスミドpEGFP-N1 (pEGFP-F (Clontech社)) は、緑色蛍光タンパク質EGFPをコードする遺伝子断片を有している。このプラスミドpEGFP-N1をXhoIおよびAgeIにより切断して開裂させておく。このとき、プラスミドはEGFP遺伝子とプロモーター (CMV IE) との間で開裂し、EGFP遺伝子の上流側がAgeIに切断され、プロモーターの下流側がXhoIに切断される。

また、FLAG tag (NH<sub>2</sub>-YIDYKDDDDKI-COOH) は、公知のタンパク質であるが、HBsAgとEGFP融合タンパク質の間に挟むことで、抗FLAG抗体によって融合タンパク質を検出できる。FLAG tagを発現させるため、センス側が配列番号2のオリゴヌクレオチド、アンチセンス側が配列番号1のオリゴヌクレオチドを用意した。このFLAG tagをコードする合成DNAは、上流側には制限酵素AccIサイトを、下流側には制限酵素AgeIサイトを有するように設計している。

以上のHBVsAg、FLAG tag、EGFP発現プラスミドは、T4DNAリガーゼにより、同一の制限酵素で切断された部位同士が結合される。これにより、上記HBVsAg、FLAG tagがEGFP発現プラスミドのプロモーターとEGFP遺伝子との間に挿入され、EGFPとHBsAgとの遺伝子を含むプラスミドpBOP001を構築した。この構築によりプラスミドのCMVプロモーターの下流に挿入された遺伝子は、アミノ末端側からニワトリリゾチーム由来分泌シグナル、HBVsAgLタンパク質、FLAG tag、EGFPタンパク質を順に融合したタンパク質をコードする。

(2) サル腎臓由来COS-7細胞への上記プラスミドの導入とその発

現

上記遺伝子の塩基配列を確認した後、上記プラスミドpBOP001をアフリカミドリサル腎臓由来COS-7細胞に遺伝子導入装置ジーンパルサー（バイオラッド）を用いて導入した。導入後、 $1 \times 10^4$ 細胞ずつ16穴ウェルプレートの各ウェルに播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下で10%ウシ胎仔血清を含むダルベッコ改変培地D-MEMを用いて一晚培養した。翌日、培地を無血清培地CHO-SFMII（Gibco-BRL）に置き換えて、さらに4日間培養し、COS-7細胞を含む培地を回収した。

まず、回収した培地中に、HBsAg粒子が発現されているかを確認めた。IMxキット（ダイナボット社）により、培地中のS抗原性を確認し培地中に粒子が検出された。

また、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対してドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）を行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG抗体によりタンパク質を検出すると、分子量約80kDaのバンドが検出され、融合タンパク質が構築どおり発現していることを確認した。

さらに、蛍光分光器により励起光480nmでEGFPの蛍光スペクトルを検出した。これにより発現したEGFP融合型HBsAgLタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

### （3）酵母細胞へのプラスミドの導入とその発現

さらに、上記融合タンパク質を酵母細胞で発現させるためにプラスミドpBOP001を、EGFP遺伝子の翻訳停止コドンの3'側に存在する制限酵

素NotIの認識部位で切断し、大腸菌DNAポリメラーゼラージフラグメントで粘着末端を埋め平滑末端とした。ここに、T4DNAリガーゼによりXhoIリンカー5'-CCTCCGAGG-3'を挿入して平滑末端を閉環結合してプラスミドを構築した。このプラスミドから、制限酵素XhoIを用いて上記融合タンパク質をコードする部分を切り出し、プラスミドpGLDLIIP39-RcTの持つHBsAg L蛋白質遺伝子と入れ換えてプラスミドpBOF002を構築した。これを用いて、酵母 (*Saccharomyces Cerevisiae* AH22R<sup>+</sup>株) を形質転換し、得られた遺伝子組換え酵母を、合成培地High-Piおよび8S5N-P400中で培養し、EGFPタンパク質融合HBsAg Lタンパク質を発現させた。

定常成長期 (約72時間後) にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical Co. 製) を用いて、whole cell extractを準備し、IMxキットによりHBsAgのS抗原性を検出した。

また、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG M2抗体 (Sigma) によりタンパク質を検出すると、分子量約80kDaのバンドが検出された。

さらに、蛍光分光器により励起光480nmでEGFPの蛍光スペクトルを検出した。これにより酵母で発現したEGFP融合型HBsAg Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

(4) 昆虫細胞へのプラスミドの導入とその発現

次に、上記pBOP002から融合蛋白をコードする遺伝子のXhoI断片を切り出し、大腸菌由来DNAポリメラーゼラージフラグメントにより末端を平滑化し、昆虫細胞安定発現用ベクター p I Z T / V 5 - H i s (Invitrogen社) のEcoRV部位へ挿入し閉環結合させた。塩基配列を確認した後、このプラスミドをpBOP003と命名した。

一方、昆虫細胞High Five株 (BTI-TN-5B1-4: Invitrogen社) は、約1ヶ月かけて次第に牛胎仔血清入り培地から無血清培地 (Ultimate Insect Serum-Free Medium: Invitrogen社) に馴化させておいた。次に、上記プラスミドpBOP003を遺伝子導入用脂質Insectin-Plus (Invitrogen社) を用いて無血清培地に馴化させたHigh Five株を形質転換した。その後、無血清培地で27℃48時間培養し、抗生物質zeocin (Invitrogen社) を400 µg/mL含有する無血清培地でさらに細胞がconfluentになるまで4~7日間培養した。

1500×g、5分間遠心により培養上清を回収し、IMxキット (ダイナボット社) により、培地中のHBsAg粒子の発現測定したところ、HBsAg粒子が発現していることが確認された。さらに、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って抗FLAG M2抗体により蛋白質を検出すると、分子量約80kDaのバンドが検出され、融合蛋白質が構築通り発現していることを確認した。さらに、蛍光分光器を用いて励起光480nmでEGFPの蛍光スペクトルを検出した。これにより発現したEGFP融合型HBsAg Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

上記EGFP融合型HBsAgLタンパク質の遺伝子配列は配列番号13に、そのアミノ酸配列は配列番号14にそれぞれ示される。

(実施例D) HBsAgにヒトインターフェロン $\omega$  (IFN $\omega$ ) が融合した粒子の作製

- 5 (1) IFN $\omega$ とHBsAgとの融合タンパク質を発現するプラスミドの作製

プラスミドpGT65-hIFN- $\alpha$  (InvivoGen) はIFN $\omega$ をコードする遺伝子断片を有している。この遺伝子断片を鋳型としてIFN $\omega$ をコードする遺伝子断片をPCR法により常法どおり増幅した。

- 10 用いた2種類のPCRプライマーは、配列番号3と配列番号4とのオリゴヌクレオチドである。上流側にAgeIサイトを、下流側に制限酵素NotIサイトを有するように設計した。

- 15 PCR産物をアガロース電気泳動で分離した後、目的のcDNAを含むバンドを回収し、TOPO TA Cloning kit (Invitrogen社) を用いてpCR2.1-TOPOベクター (Invitrogen社) にサブクローニングした。挿入した塩基配列を情報 (pORF-hIFN $\alpha$  v. 11製品に添付された資料) に従って確認後、制限酵素AgeIとNotIでこのcDNA断片を切り出し、前記プラスミドpEGFP-N1のAgeIとNotI部位を利用してEGFP遺伝子と入れ換えてプラスミドpBOP004を構築した。

- 20 上記プラスミドpBOP004にFLAG tag遺伝子およびHBsAg遺伝子を挿入する。挿入方法は前記実施例Cの(1)に記載した方法と同様である。これにより、プラスミドpBOP005を構築した。この構築によりプラスミドのCMVプロモーターの下流に挿入された遺伝子は、アミノ末端側からニワトリリゾチーム由来分泌シグナル、HBV sAgLタンパク

質、FLAG tag、IFN $\omega$ を順に融合したタンパク質をコードする。

(2) サル腎臓由来COS-7細胞への上記プラスミドの導入とその発現

上記遺伝子の塩基配列を確認した後、上記プラスミドpBOP005をアフリカミドリサル腎臓由来COS-7細胞に遺伝子導入装置ジーンパルサー（バイオラッド）を用いて導入した。導入後10%子牛胎児血清を含むダルベッコ改変培地を用いて一晚培養した。翌日、培地を無血清培地CHO-SFMII（Gibco-BRL）に置き換えて、さらに4日間培養し、COS-7細胞を含む培地を回収した。

培地中のS抗原性をIMxキット（ダイナボット社）により確認し、培地中に粒子が検出された。また、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG M2抗体によりタンパク質を検出すると、分子量約70 kDaのバンドが検出され、融合タンパク質が構築どおり発現していることを確認した。これにより発現したIFN $\omega$ 融合型HBsAg Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

(3) 酵母細胞へのプラスミドの導入とその発現

さらに、上記融合タンパク質を酵母細胞で発現させるためにプラスミドpBOP005を、IFN $\omega$ 遺伝子の翻訳停止コドンの3'側に存在する制限酵素NotIの認識部位で切断し、大腸菌DNAポリメラーゼラージフラグメントで粘着末端を埋め平滑末端とした。ここに、T4DNAリガーゼによりXhoIリンカー5'-CCTCCGAGG-3'を挿入して平滑末端を閉環結合してプラ

スミドを構築した。このプラスミドから、制限酵素XhoIを用いて上記融合タンパク質をコードする部分を切り出し、プラスミド pGLDLIP 39-RcT の持つ HBsAg L 蛋白質遺伝子と入れ換えてプラスミド pBOP006 を構築した。これを用いて、酵母 (Saccharomyces Cerevisiae AH22R 株) を形質転換し、得られた遺伝子組換え酵母を、合成培地 High-Pi および 8S5N-P400 中で培養し、IFN $\omega$  タンパク質融合型 HBsAg L タンパク質を発現させた。

定常成長期 (約 72 時間後) にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical Co. 製) を用いて、whole cell extract を準備し、IMx キットにより S 抗原性を検出した。また、IMx のアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対して SDS-PAGE を行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG M2抗体 (Sigma) により試料中の融合タンパク質を検出すると、分子量約 70 kDa のバンドが検出された。これにより、酵母で発現したヒトインターフェロン $\omega$  融合型 HBsAg L タンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

#### (4) 昆虫細胞へのプラスミドの導入とその発現

次に、上記 pBOP006 から融合蛋白をコードする遺伝子の XhoI 断片を切り出し、大腸菌由来 DNA ポリメラーゼラージフラグメントにより末端を平滑化し、昆虫細胞安定発現用ベクター pIZT/V5-His (Invitrogen 社) の EcoRV 部位へ挿入し閉環結合させた。塩基配列を確認した後、このプラスミドを pBOP007 と命名した。

一方、昆虫細胞 High Five 株 (BTI-TN-5B1-4 : Invitrogen 社) は、約

1ヶ月かけて次第に牛胎仔血清入り培地から無血清培地 (Ultimate Insect Serum-Free Medium: Invitrogen社) に馴化させておいた。次に、上記プラスミド pB0P007 を遺伝子導入用脂質 Insectin-Plus (Invitrogen社) を用いて無血清培地に馴化させた High Five 株を形質転換した。その後、無血清培地で 27℃ 48 時間培養し、抗生物質 zeocin (Invitrogen社) を 400  $\mu\text{g/mL}$  含有する無血清培地でさらに細胞が confluent になるまで 4~7 日間培養した。

1500 $\times$ g、5 分間遠心により培養上清を回収し、IMx キット (ダイナボット社) により、培地中の HBsAg 粒子の発現測定したところ、HBsAg 粒子が発現していることが確認された。さらに、IMx のアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し沈降した蛋白質に対して SDS-PAGE を行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って抗 FLAG M2 抗体により蛋白質を検出すると、分子量約 70 kDa のバンドが検出され、融合蛋白質が構築通り発現していることを確認した。これにより発現したヒトインターフェロンの融合型 HBsAg L タンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

上記ヒトインターフェロンの融合型 HBsAg L タンパク質の遺伝子配列は配列番号 15 に、そのアミノ酸配列は配列番号 16 にそれぞれ示される。

(実施例 E) HBsAg にヒトインターフェロン  $\beta 1$  (IFN  $\beta 1$ ) が融合した粒子の作製

(1) IFN  $\beta 1$  と HBsAg との融合タンパク質を発現するプラスミドの作製



プラスミドpCMV (Hu beta) は I F N  $\beta$  1 をコードする遺伝子断片を有している。この遺伝子断片を鋳型として I F N  $\beta$  1 をコードする遺伝子断片を P C R 法により常法どおり増幅した。

5 用いた 2 種類の P C R プライマーは、センス側が配列番号 5 のオリゴヌクレオチド、アンチセンス側が配列番号 6 のオリゴヌクレオチドである。上流側には制限酵素AgeIサイトを、下流側には制限酵素NotIサイトを有するように設計した。

10 P C R 産物をアガロース電気泳動で分離した後、目的の c D N A を含むバンドを回収し、TOP0 TA Cloning kit (Invitrogen社) を用いてpCR 2.1-TOP0ベクター (Invitrogen社) にサブクローニングした。挿入した塩基配列を情報 (GenBank accession no. M28622) に従って確認後、制限酵素AgeIとNotIでこのcDNA断片を切り出し、前記プラスミドpEGFP-N1のAgeIとNotI部位を利用してEGFP遺伝子と入れ換えてプラスミドを構築した。

15 上記プラスミドにFLAG tag遺伝子およびH B s A g 遺伝子を挿入する。挿入方法は前記実施例 C の ( 1 ) に記載した方法と同様である。これにより、プラスミドpBOP008を構築した。この構築によりプラスミドのCMVプロモーターの下流に挿入された遺伝子は、アミノ末端側からニワトリリゾチーム由来分泌シグナル、H B V s A g L タンパク質、FLAG  
20 tag、I F N  $\beta$  1 を順に融合したタンパク質をコードする。

( 2 ) サル腎臓由来C O S - 7 細胞への上記プラスミドの導入とその発現

上記遺伝子の塩基配列を確認した後、上記プラスミドpBOP008をアフリカミドリサル腎臓由来C O S - 7 細胞に遺伝子導入装置ジーンパルサ

ー（バイオラッド）を用いて導入した。導入後10%子牛胎児血清を含むダルベッコ改変培地を用いて一晚培養した。翌日、培地を無血清培地CHO-SFMII（Gibco-BRL）に置き換えて、さらに1週間培養し、COS-7細胞を含む培地を回収した。

5 培地中のS抗原性をIMxキット（ダイナボット社）により確認し、培地中に粒子が検出された。また、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG M2抗体によりタンパク質を検出すると、分子量約70 kDaのバンドが検出され、融合タンパク質が構築どおり発現していることを確認した。これにより発現したIFN $\beta$ 1融合型HBsAg Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

### （3）酵母細胞へのプラスミドの導入とその発現

15 さらに、上記融合タンパク質を酵母細胞で発現させるためにプラスミドpBOP008を、IFN $\beta$ 1遺伝子の翻訳停止コドンの3'側に存在する制限酵素NotIの認識部位で切断し、大腸菌DNAポリメラーゼラージフラグメントで粘着末端を埋め平滑末端とした。ここに、T4DNAリガーゼによりXhoIリンカー5'-CCTCCGAGG-3'を挿入して平滑末端を閉環結合してプラスミドを構築した。このプラスミドから、制限酵素XhoIを用いて上記融合タンパク質をコードする部分を切り出し、プラスミドpGLDLII P39-RcTの持つHBsAg L蛋白質遺伝子と入れ換えてプラスミドpBOP009を構築した。これを用いて、酵母（*Saccharomyces Cerevisiae* AH22R<sup>-</sup>株）を形質転換し、得られた遺伝子組換え酵母を、合成培地

High-Piおよび8S5N-P400中で培養し、I F N  $\beta$  1タンパク質融合型H B s A g Lタンパク質を発現させた。

定常成長期（約72時間後）にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent（Pierce Chemical Co.製）を用いて、whole  
5 cell extractを準備し、I M xキットによりS抗原性を検出した。また、I M xのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対してS D S - P A G Eを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG M2抗体（Sigma）により試料中の融合タンパク質を検出すると、分子量約70 k D aのバンド  
10 が検出された。これにより、酵母で発現したヒトインターフェロン $\beta$  1融合型H B s A g Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

#### （4）昆虫細胞へのプラスミドの導入とその発現

次に、上記pBOP009から融合蛋白をコードする遺伝子のXhoI断片を切り出し、大腸菌由来DNAポリメラーゼラージフラグメントにより末端を  
15 平滑化し、昆虫細胞安定発現用ベクターp I Z T / V 5 - H i s（Invitrogen社）のEcoRV部位へ挿入し閉環結合させた。塩基配列を確認した後、このプラスミドをpBOP010と命名した。

一方、昆虫細胞High Five株（BTI-TN-5B1-4：Invitrogen社）は、約  
20 1ヶ月かけて次第に牛胎仔血清入り培地から無血清培地（Ultimate Insect Serum-Free Medium：Invitrogen社）に馴化させておいた。次に、上記プラスミドpBOP010を遺伝子導入用脂質Insectin-Plus（Invitrogen社）を用いて無血清培地に馴化させたHigh Five株を形質転換した。その後、無血清培地で27℃48時間培養し、抗生物質zeocin（Invitrogen社

) を400  $\mu\text{g/mL}$ 含有する無血清培地でさらに細胞がconfluentになるまで4～7日間培養した。

1500 $\times g$ 、5分間遠心により培養上清を回収し、IMxキット（ダイナ  
ボット社）により、培地中のHBsAg粒子の発現測定したところ、H  
5 B s A g 粒子が発現していることが確認された。さらに、IMxのアガ  
ロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降  
し沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタン  
ブロッティングを行って抗FLAG M2抗体により蛋白質を検出すると、分  
子量約70 kDaのバンドが検出され、融合蛋白質が構築通り発現して  
10 いることを確認した。これにより発現したヒトインターフェロン $\beta$ 1融  
合型HBsAg Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形  
成していることを確認した。

上記ヒトインターフェロン $\beta$ 1融合型HBsAg Lタンパク質の遺伝  
子配列は配列番号17に、そのアミノ酸配列は配列番号18にそれぞれ  
15 示される。

（実施例F）HBsAgにヒト肝細胞成長因子（HGF）が融合した  
粒子の作製

（1）HGFとHBsAgとの融合タンパク質を発現するプラスミドの  
作製

20 ヒト肝臓由来RNA（ClonTech）から、Oligo-dTプライマーを用いて逆  
転写酵素スーパースクリプトII（Gibco-BRL）によりcDNAを合成し  
た。得られたcDNAを、HGF遺伝子の特異的に増幅する配列番号7  
および配列番号8のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR  
を行うことにより、約2.2 kbpのHGF遺伝子を増幅した。この

とき、プライマーは、増幅されたHGF遺伝子が、上流側にAgeIサイトを、下流側に制限酵素NotIサイトを有するように設計した。

PCR産物をアガロース電気泳動で分離した後、目的のcDNAを含むバンド（約2.2kbp）を回収し、TOPO TA Cloning kit（Invitrogen社）を用いてpCR2.1-TOPOベクター（Invitrogen社）にサブクローニングした。

次に、プラスミドの構築を行いやすくするため、HGF遺伝子中に存在する2箇所の制限酵素認識部位を改変した。その手順を以下に示す。

二組の相補的な合成DNA、配列番号9のオリゴヌクレオチドとその相補配列である配列番号10のオリゴヌクレオチド、および配列番号11のオリゴヌクレオチドとその相補配列である配列番号12のオリゴヌクレオチドを用いて、QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit（Stratagene社）により上記プラスミドDNAのPCRを行った。

まず、最初の一組のプライマーにより、耐熱性DNAポリメラーゼとしてPfu DNA polymerase（Stratagene）を用いて、PCRを行った。PCRは、95℃30秒間の変性、55℃1分間のアニーリング、68℃30分間の合成反応を30回繰り返して行った。その後、PCR産物を制限酵素Dpn Iで処理して、大腸菌DH5αを形質転換した。そして、形質転換した大腸菌DH5αを培養し、出現コロニーからベクターDNAを抽出し、塩基配列を確認して、変異導入されたプラスミドを選抜した。次に、得られたプラスミドを鋳型として二組目のプライマーを用いて同様の操作を行った。その結果HGF cDNAにコードされるアミノ酸を変更することなく2ヶ所のXhoI認識部位が消去されたヒトHGF cDNAを保持するプラスミドpBOP011が得られた。

塩基配列をGenBankの情報 (GenBank accession no. M29145) により確認した後、制限酵素AgeIおよびNotIでこのcDNA断片を切り出し、前記プラスミドpEGFP-N1のAgeIとNotI部位を利用してEGFP遺伝子と入れ換えてプラスミドを構築した。

5       上記プラスミドにFLAG tag遺伝子およびHBsAg遺伝子を挿入する。  
挿入方法は前記実施例Cの(1)に記載した方法と同様である。これにより、プラスミドpBOP012を構築した。この構築によりプラスミドのCMVプロモーターの下流に挿入された遺伝子は、アミノ末端側からニ  
10       ワトリリゾチーム由来分泌シグナル、HBsAgLタンパク質、FLAG tag、ヒトHGFを順に融合したタンパク質をコードする。

(2) サル腎臓由来COS-7細胞への上記プラスミドの導入とその発現

上記遺伝子の塩基配列を確認した後、上記プラスミドpBOP012をアフリカミドリサル腎臓由来COS-7細胞に遺伝子導入装置ジーンパルサー  
15       ー (バイオラッド) を用いて導入した。導入後10%子牛胎児血清を含むダルベッコ改変培地を用いて一晩培養した。翌日、培地を無血清培地CHO-SFMII (Gibco-BRL) に置き換えて、さらに4日間培養し、COS-7細胞を含む培地を回収した。

20       培地中のS抗原性をIMxキット (ダイナボット社) により確認し、培地中に粒子が検出された。また、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG M2抗体によりタンパク質を検出すると、分子量約125 kDaのバンドが検出され、融合タンパク質が構築どおり発現している

ことを確認した。これにより発現したヒトHGF融合型HBsAgLタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

### (3) 酵母細胞へのプラスミドの導入とその発現

5       さらに、上記融合タンパク質を酵母細胞で発現させるためにプラスミドpBOP012を、HGF遺伝子の翻訳停止コドンの3'側に存在する制限酵素NotIの認識部位で切断し、大腸菌DNAポリメラーゼラージフラグメントで粘着末端を埋め平滑末端とした。ここに、T4DNAリガーゼによりXhoIリンカー5'-CCTCCGAGG-3'を挿入して平滑末端を閉環結合してプラスミドを構築した。このプラスミドから、制限酵素XhoIを用いて上記融合タンパク質をコードする部分を切り出し、プラスミドpGLDLIIP39-RcTの持つHBsAgL蛋白質遺伝子と入れ換えてプラスミドpBOP013を構築した。これを用いて、酵母 (*Saccharomyces Cerevisiae* A H22R<sup>-</sup>株) を形質転換し、得られた遺伝子組換え酵母を、合成培地High-Piおよび8S5N-P400中で培養し、ヒトHGFタンパク質融合型HBsAgLタンパク質を発現させた。

20       定常成長期 (約72時間後) にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical Co. 製) を用いて、whole cell extractを準備し、IMxキットによりHBsAgLタンパク質のS抗原性を検出した。また、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG M2抗体 (Sigma) により試料中の融合タンパク質を検出すると、分子量約125 kDaのバンドが検出された。これにより、酵母で発現

したヒトHGF融合型HBsAg Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

#### (4) 昆虫細胞へのプラスミドの導入とその発現

次に、上記pBOP013から融合蛋白をコードする遺伝子のXhoI断片を切り出し、大腸菌由来DNAポリメラーゼラージフラグメントにより末端を平滑化し、昆虫細胞安定発現用ベクターpIZT/V5-His (Invitrogen社) のEcoRV部位へ挿入し閉環結合させた。塩基配列を確認した後、このプラスミドをpBOP014と命名した。

一方、昆虫細胞High Five株 (BTI-TN-5B1-4: Invitrogen社) は、約1ヶ月かけて次第に牛胎仔血清入り培地から無血清培地 (Ultimate Insect Serum-Free Medium: Invitrogen社) に馴化させておいた。次に、上記プラスミドpBOP014を遺伝子導入用脂質Insectin-Plus (Invitrogen社) を用いて無血清培地に馴化させたHigh Five株を形質転換した。その後、無血清培地で27℃48時間培養し、抗生物質zeocin (Invitrogen社) を400 µg/mL含有する無血清培地でさらに細胞がconfluentになるまで4~7日間培養した。

1500×g、5分間遠心により培養上清を回収し、IMxキット (ダイナボット社) により、培地中のHBsAg Lタンパク質粒子の発現測定したところ、HBsAg Lタンパク質粒子が発現していることが確認された。さらに、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って抗FLAG M2抗体により蛋白質を検出すると、分子量約125 kDaのバンドが検出され、融合蛋白質が構築通り発現していることを確認した。これにより発現した



ヒトHGF融合型HBsAgLタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

上記ヒトHGF融合型HBsAgLタンパク質の遺伝子配列は配列番号19に、そのアミノ酸配列は配列番号20にそれぞれ示される。

5 (実施例G) ヒト肝癌細胞HepG2におけるHBsAgLタンパク質粒子によるGFPの導入

指数増殖期にあるヒト肝癌細胞HepG2を $1 \times 10^5$  cells/wellになるように、3.5 cmガラス底皿シャーレに植菌し、37℃、5% CO<sub>2</sub>存在下で10%ウシ胎児血清を含むD-MEMを用いて一晩培養した。

10 翌日、実施例Cで使用したHBsAgLタンパク質にEGFPが融合した粒子を10 μg/wellになるように添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub>存在下で6時間培養した。

また、陰性対照として、ヒト扁平上皮癌由来細胞A431 (JCRB9009) についても同様の操作を行った。

15 HepG2とA431において、細胞内でのGFPの発現の様子を共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察した。

これにより、ヒト肝癌細胞HepG2にGFPに由来する蛍光を認めた(図5)。しかし、ヒト扁平上皮癌由来細胞A431には蛍光を認めなかった(図6)。

20 以上より、HBsAgLタンパク質粒子を用いることにより、ヒト肝細胞に対して極めて高い特異性と効率でタンパク質が構造を維持したまま導入されることが示された。したがって、この発明の物質運搬体は、極めて有効であることが確認された。

(実施例H) ヒト肝癌を移植したヌードマウスに対するHBsAgL

### タンパク質粒子による物質導入

胆癌マウスは、ヌードマウス（系統：BALB/c nu/nu、微生物学的品質：SPF、性別：オス5週齢）の両側背部皮下に、ヒト肝癌由来細胞HuH-7（JCRB0403）を $1 \times 10^7$ 細胞皮下に注射し、移植腫瘍が直径2cm程度の固形癌になるまで2～4週間生育させて得た。

また、陰性対照として、ヒト大腸癌由来細胞WiDr（ATCC CCL-218）についても、同様にヌードマウスに移植した。

それぞれのマウスに、実施例CのHBsAgLタンパク質にEGFPが融合した粒子50 $\mu$ gを、腹腔内に26G注射針を使用して投与した。投与後12時間後にマウスを屠殺し、腫瘍部、肝臓、脾臓、腎臓、腸管を摘出し、GFP用樹脂包埋キット（Technovit7100）を用いて組織を固定・包埋した。

具体的には、固定は4%中和ホルムアルデヒドに浸漬して行い、脱水は70%EtOHで室温2時間、96%EtOHで室温2時間、100%EtOHで室温1時間、予備浸漬は100%EtOH/Technovit7100等量混合液で室温2時間行った。その後、Technovit7100で室温24時間以内の浸漬を行い、取り出した後、室温で1時間および37℃で1時間静置して重合反応させた。

常法に従って、切片を作製し、同時にヘマトキシンエオリン染色（一般的な組織染色）を行って、蛍光顕微鏡によりHBsAgLタンパク質粒子投与群と非投与群のGFPによる蛍光を比較した。

これにより、ヒト肝癌由来HuH-7細胞による胆癌マウスの腫瘍部にGFPに由来する蛍光を認めた（図7）。しかし、同マウスより同時に摘出した肝臓、脾臓、腎臓、腸管には蛍光を認めなかった。さらに、ヒ

ト大腸癌由来WiDr細胞による胆癌マウスの腫瘍、肝臓、脾臓、腎臓、腸管にも蛍光を認めなかった(腫瘍部：図8)。

以上より、HBsAgLタンパク質粒子を用いることにより、実験動物レベルでも、ヒト肝細胞に対して極めて高い特異性と効率でタンパク質が構造を維持したまま導入されることが示された。したがって、この発明の物質運搬体は、極めて有効であることが確認された。

尚、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。

#### 産業上の利用の可能性

以上のように、本発明に係る薬剤は、静脈注射などといった簡便な方法で、特定の細胞または組織に対して選択的かつ効率的に疾患治療用の細胞導入物質を送り込むことができるので、従来の遺伝子治療と大きく異なり、外科手術を必要とせず、副作用の心配も極めて低く、そのまま臨床応用可能なものである。

また、粒子を形成するタンパク質に細胞導入物質が融合したかたちで粒子を形成することにより、粒子形成の際、あわせて粒子内部に細胞導入物質を包含させることができ、薬剤の製造を容易にできる。

## 請 求 の 範 囲

1. 特定の細胞に対する認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質  
からなる中空ナノ粒子において、当該タンパク質に疾患治療用の細胞導  
5 入物質が融合されてなる薬剤。

2. 上記タンパク質は、B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質であるこ  
とを特徴とする請求の範囲1記載の薬剤。

3. 上記薬剤は、上記タンパク質をコードする遺伝子と、その下流側に  
上記細胞導入物質をコードする遺伝子とを含むベクターにて真核細胞を  
10 形質転換させ、当該真核細胞に遺伝子発現させることにより得られるこ  
とを特徴とする請求の範囲1または2記載の薬剤。

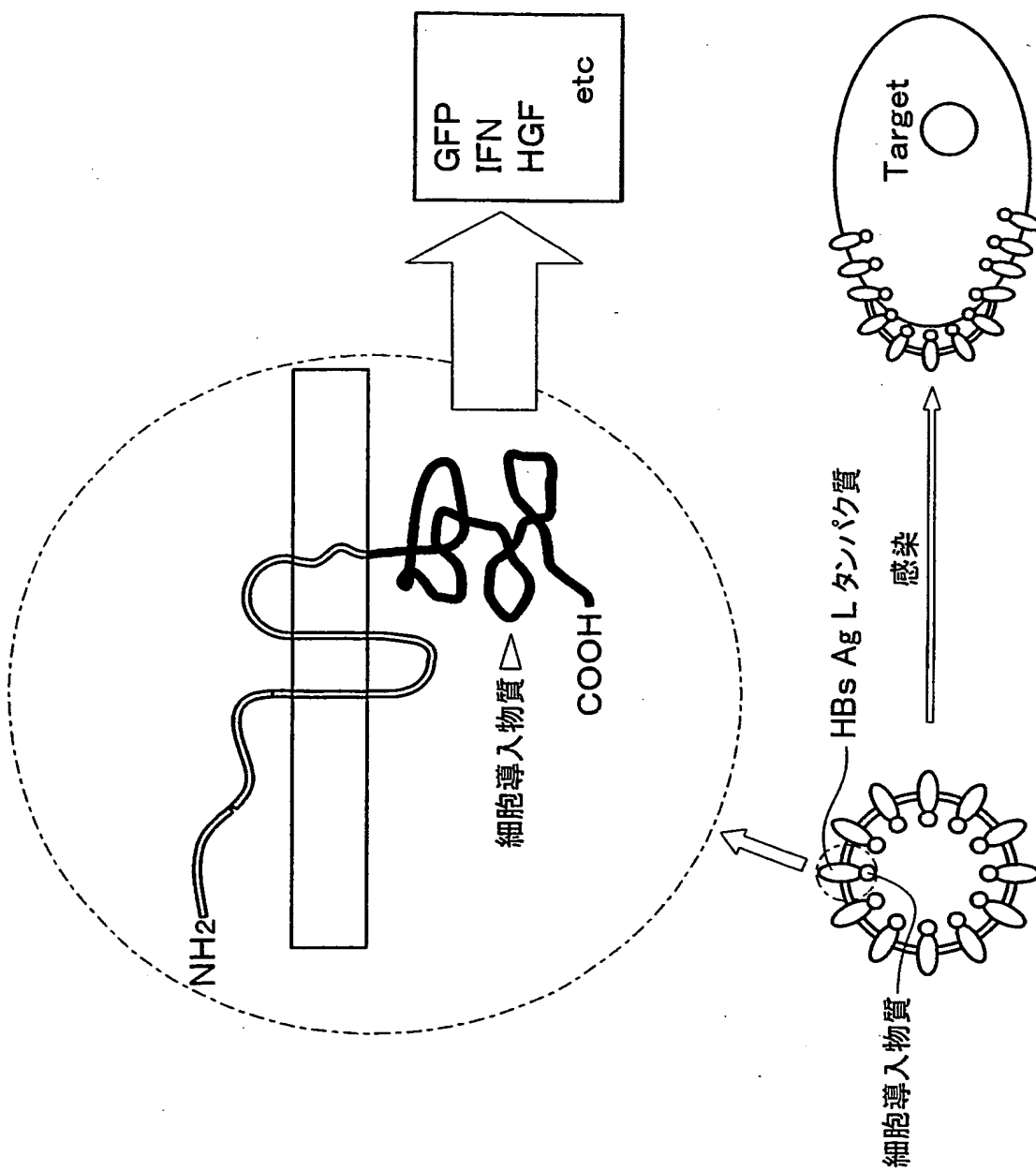
4. 上記真核細胞は、動物細胞、酵母または昆虫細胞であることを特徴  
とする請求の範囲3記載の薬剤。

5. 肝臓疾患治療用に用いられることを特徴とする請求の範囲1ないし  
15 4のいずれか1項に記載の薬剤。

6. 上記細胞導入物質は、インターフェロンまたは肝細胞成長因子であ  
ることを特徴とする請求の範囲1ないし5のいずれか1項に記載の薬剤。

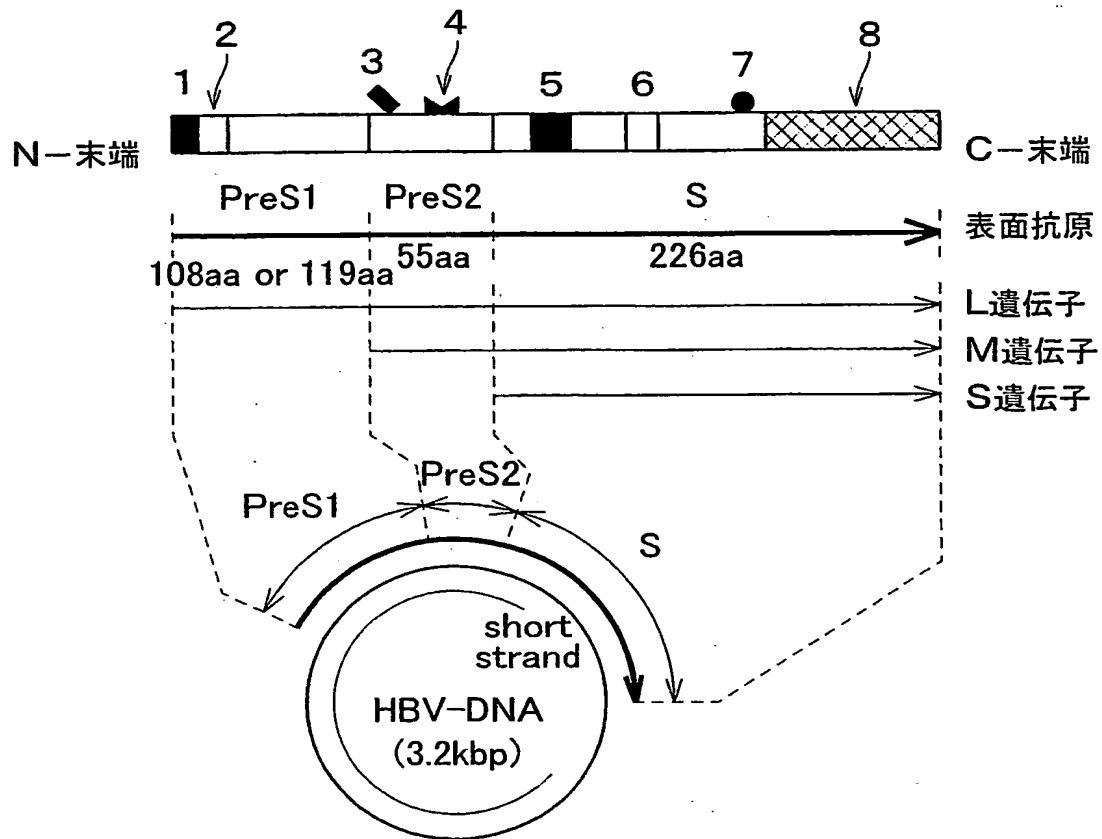
7. 静脈注射により人体に投与されることを特徴とする請求の範囲1な  
いし6のいずれか1項に記載の薬剤。

20 8. 請求の範囲1ないし7のいずれか1項に記載の薬剤を投与すること  
による疾患の治療方法。



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

図2

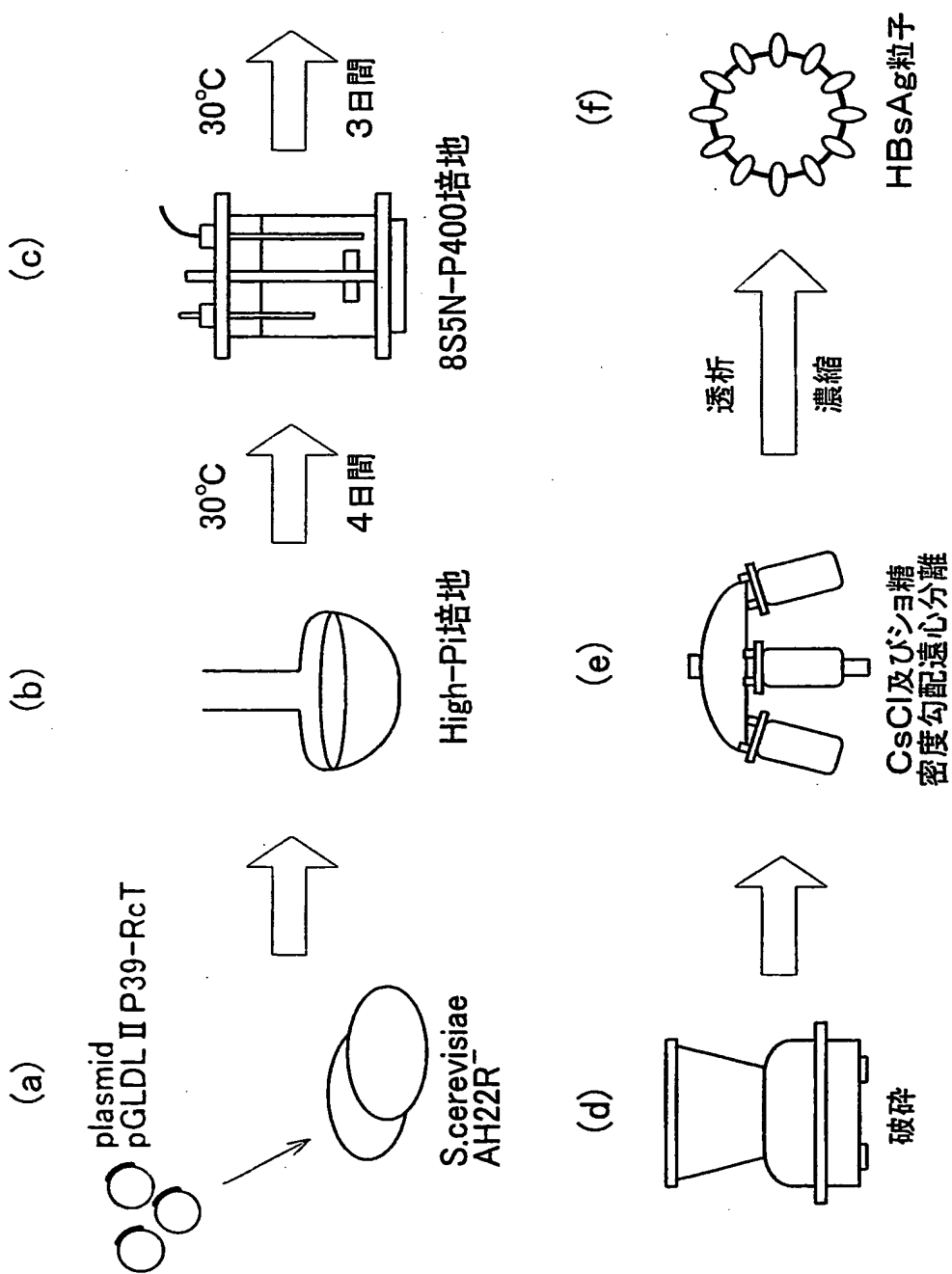


- 1 粒子形成抑制部位
- 2 直接的なヒト肝細胞特異的レセプター
- 3 糖鎖1
- 4 間接的なヒト肝細胞特異的レセプター(重合ヒト血清アルブミンレセプター)
- 5 膜貫通領域1
- 6 膜貫通領域2
- 7 糖鎖2
- 8 膜貫通領域3

THIS PAGE BLANK (USPTO)



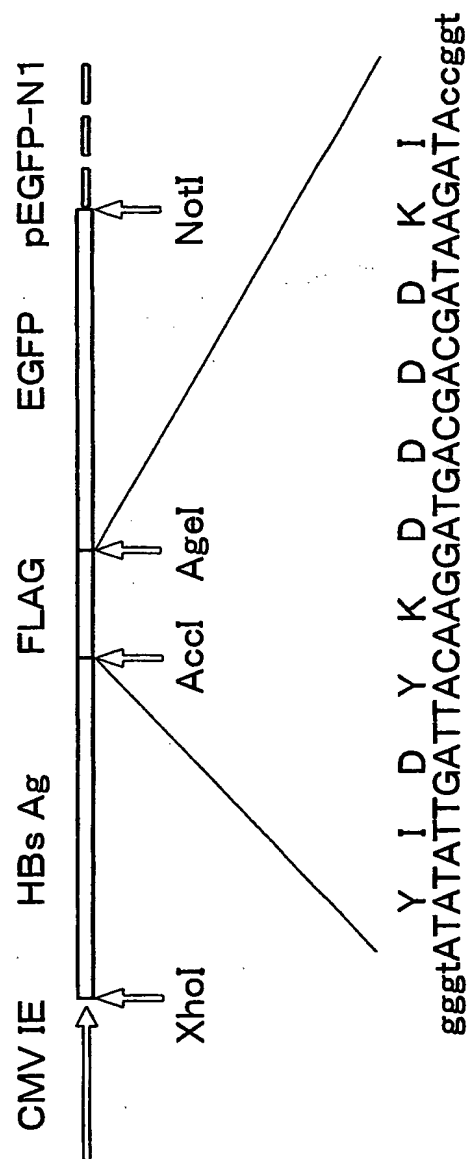
図3



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4/11

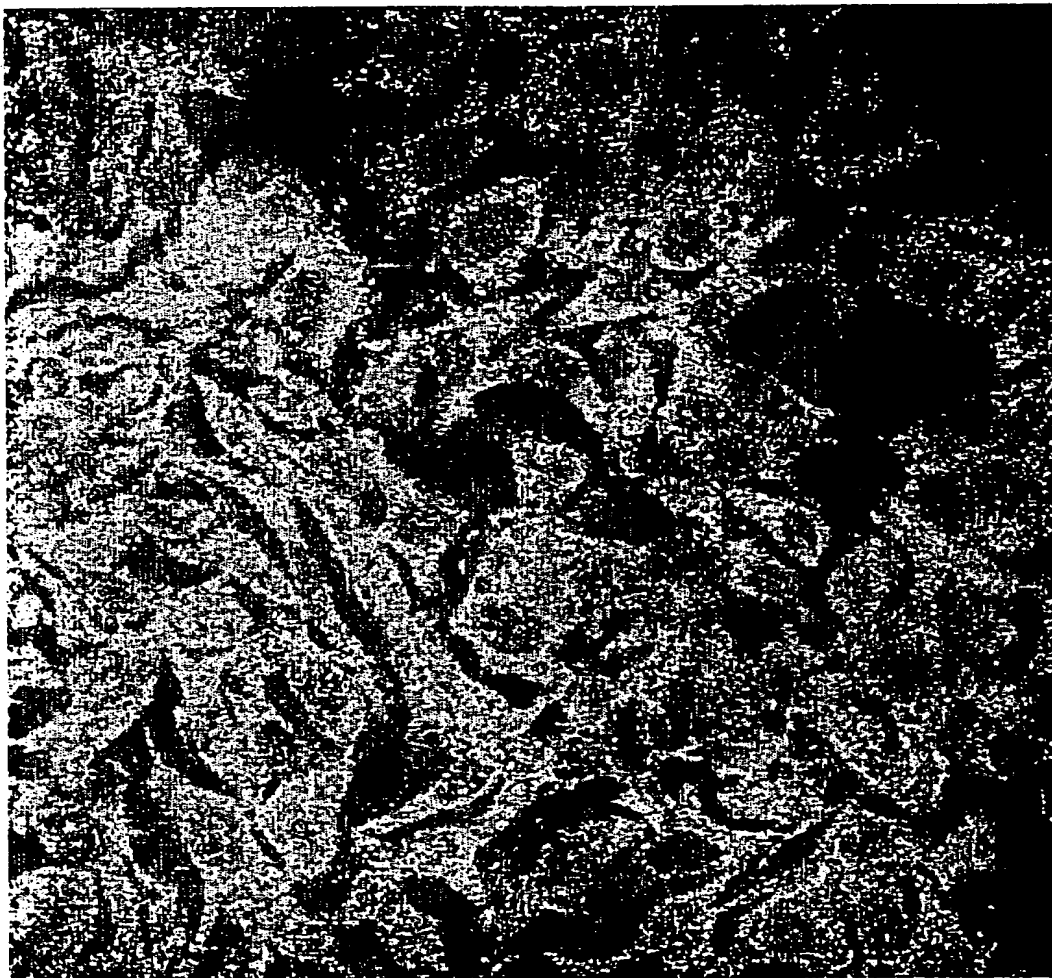
図4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

5/11

図5



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

6/11

図6

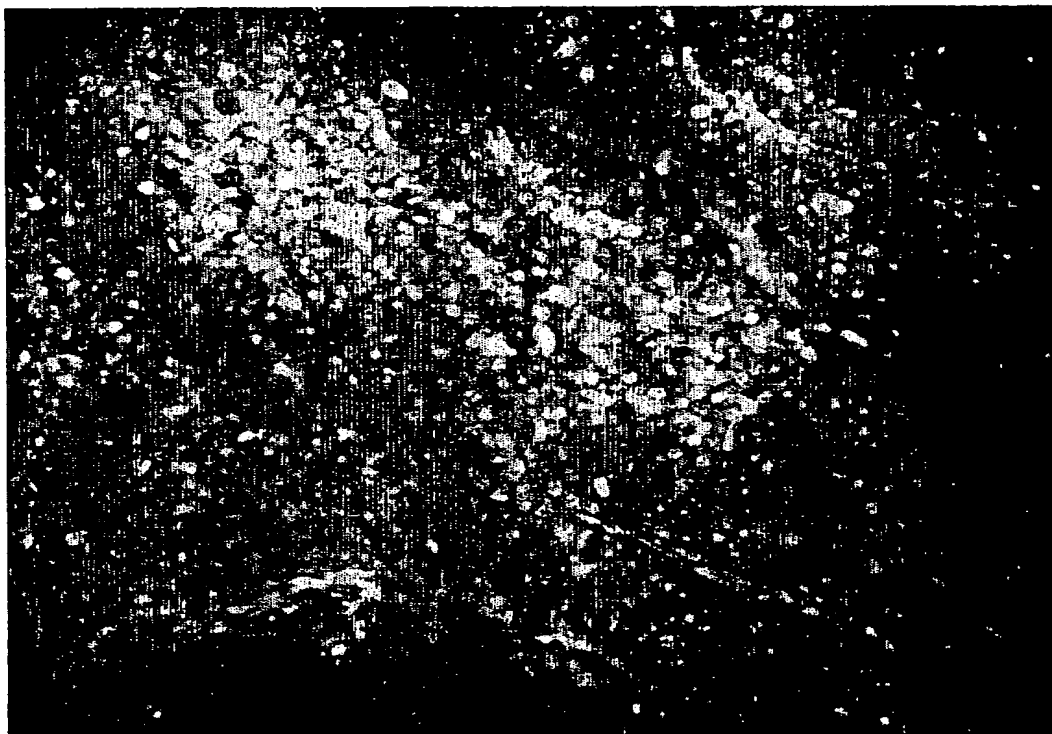


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



7/11

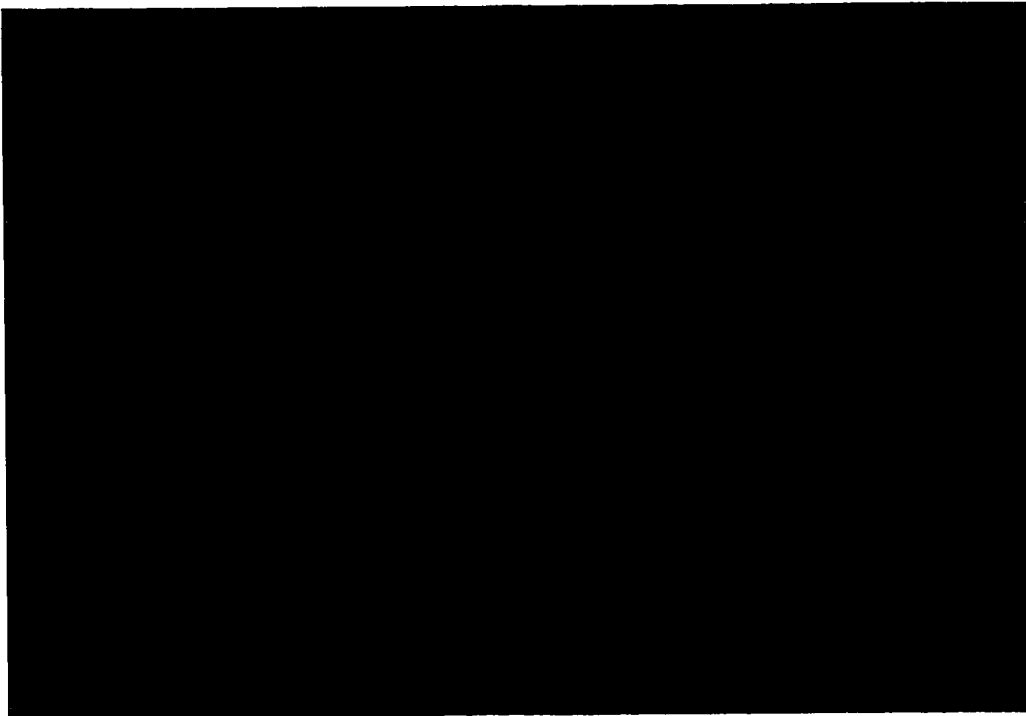
図7



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

8/11

図8



THIS PAGE BLANK (USPTO)

9/11

図9

RNase等の細胞質RNAを攻撃するタンパク質	Pancreatic type Rnases from vertebrates
	RNase 1 or Bovine RNase A
	Eosinophil derived neurotoxin
	Eosinophil cationic protein
	Liver RNase (RNase 4)
	Angiogenin
	Bovine seminal RNase
	Frog Rnases (Onconase etc.)
膜透過を妨げるタンパク質	Streptolysin (Streptococcus pyogenes)
	Cholesterol binding toxins (Streptococcus. Bacillus. Clostridium. Listeria)
	alpha-Toxin (Staphylococcus aureus)
	Delta-Toxin (Staphylococcus aureus) and melittin (Apis mellifera)
	Aerolysin (Aeromonas hydrophila)
	Escherichia coli hemolysin
シグナル伝達を妨げるタンパク質	Cholera toxin (Vibrio cholerae)
	Heat-labile enterotoxins (Escherichia ColiD)
	Pertussis toxin (Bordetella pertussis)
	Exoenzyme C3 (Clostridium botulinum)
	Adenylate cyclase toxin (Bordetella sp.)
	Anthrax edema factor (Bacillus anthracis)
タンパク質合成を妨げるタンパク質	Diphtheria toxin (Corynebacterium diphtheriae)
	Pseudomonas aeruginosa exotoxin A
	Shiga toxins (Shigella dysenteriae serotype I, Escherichia Coli)
	Ricin (Ricinus communis)
	Ribosome-inactivating proteins
	alpha-Sarcin and related toxins (Aspergillus)
細胞骨格を攪乱するタンパク質	C2 toxin (Clostridium botulinum type C and D)
	Cytotoxic necrotizing factors (Escherichia coli)
	Enterotoxin A and cytotoxin B (Clostridium difficile)
	ActA (Listeria monocytogenes)
	IcsA (Shigella flexneri)
	Zonula occludens toxin (Vibrio cholerae)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/11

図10

免疫または炎症反応を抑えるタンパク質	Pyrogenic exotoxins (superantigens) ( <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Streptococcus pyogenes</i> )
	Anthrax lethal toxin ( <i>Bacillus anthracis</i> )
	Leukocidins and gamma lysins ( <i>Staphylococcus</i> sp.)
膜輸送を攪乱するタンパク質	Tetanus neurotoxin ( <i>Clostridium tetani</i> )
	VAMP-specific botulinum neurotoxins
	Botulinum neurotoxins type A and E ( <i>Clostridium botulinum</i> )
	Botulinum neurotoxin type C ( <i>Clostridium botulinum</i> )
	Vacuolating cytotoxin ( <i>Helicobacter pylori</i> )
ナトリウムチャネル攪乱タンパク質	alpha-Scorpion toxins
	beta-Scorpion toxins
	Excitatory insect selective neurotoxins from scorpion venoms
	Depressant insect selective neurotoxins from scorpion venoms
	mu-Conotoxins ( <i>Conus geographus</i> )
	mu-Agatoxins ( <i>Agelenopsis aperta</i> )
	Anthopleurin-A, -B, and -C (anemone toxin)
	Anemone toxins (type II)
	Calitoxins
カリウムチャネル攪乱タンパク質	Kalioxin
	Scyllatoxin ( <i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i> )
	Apamin (honey bee <i>Apis mellifera</i> )
	MCD peptide (honey bee <i>Apis mellifera</i> )
	Charybdotoxin and iberiotoxin ( <i>Leiurus quinquestriatus</i> var. <i>hebraeus</i> and <i>Buthus tamulus</i> )
	Margatoxin, noxiustoxin, and kalioxin ( <i>Centruroides margaritatus</i> , <i>Centruroides noxius</i> , <i>Androctonus mauretanicus</i> )
	Dendrotoxins ( <i>Dendroaspis</i> species)
	Sea anemone potassium channel toxins

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## 図11

11/11

カルシウムチャネル攪乱タンパク質	Omega-Conotoxins ( <i>Conus</i> spp.)
	Omega-Agatoxins ( <i>Agelenopsis aperta</i> )
	Omega-Grammotoxin SIA ( <i>Grammostola spatulata</i> Chilean pink tarantula)
	Hololena toxin ( <i>Hololena curta</i> )
	PLTXII ( <i>Plectreurys tristes</i> )
	Calciseptine ( <i>Dendroaspis polylepis</i> )
	Calcicludeine ( <i>Dendroaspis angusticeps</i> )
	beta-Leptinotarsin-h
	Taicatoxin ( <i>Oxyuranus scutellatus scutellatus</i> )
アセチルコリン受容体攪乱タンパク質	alpha-Bungarotoxin ( <i>Bungarus multicinctus</i> )
	alpha-Cobratoxin ( <i>Naja kaouthia</i> )
	Erabutoxins ( <i>Laticauda semifasciata</i> )
	Toxin alpha (' <i>Naja nigricollis</i> ')
	kappa-Bungarotoxin ( <i>Bungarus multicinctus</i> )
	alpha-Conotoxins ( <i>Conus</i> spp.)
	Snake toxins against muscarinic acetylcholine receptors
	Muscarinic toxin-1~-5, -7, m1-toxin from green mamba ( <i>Dendroaspis angusticeps</i> )
	Muscarinic toxin-alpha, -beta from black mamba ( <i>Dendroaspis polylepis</i> )
リアノジン受容体カルシウムイオンチャンネル攪乱タンパク質	Helothermine ( <i>Heloderma horridum horridum</i> )
シナプス前攪乱タンパク質	beta-Bungarotoxin ( <i>Bungarus multicinctus</i> )
	Rattlesnake venom neurotoxins: crotoxin-related proteins
	Ammodytotoxins ( <i>Vipera ammodytes ammodytes</i> )
	Notexins ( <i>Notechis scutatus scutatus</i> )
	Textilotoxin ( <i>Pseudonaja textilis textilis</i> )
	Tai poxin
	alpha-Latrotoxin (black widow spider)
	alpha-Latroinsectotoxin ( <i>Latrodectus mactans tenebrosus</i> )
	Pardaxin ( <i>Pardachirus marmoratus</i> )
	Palytoxin (Corals of the spp. <i>Palythoa</i> )
	Equinatoxins ( <i>Actinia equina</i> L., sea anemone)
グルタミン酸受容体攪乱タンパク質	Conantokins ( <i>Conus</i> spp.)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Therapeutic drug containing drug components expressed and fused  
with proteins composing nano-particles

<130> P023P01

<150> JP 2002-097280

<151> 2002-3-29

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Sequence

<400> 1

ccggtatctt atcgtegtca tccttgtaat caatat

36

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Sequence

<400> 2

atatattgat tacaaggatg acgacgataa gata

34

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

ataccggtgg gctgtgatct gcctcaga

28

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

atgcggccgc tcaagatgag cccaggtc

28

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

## Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 5

gaaccggtga gctacaactt gcttggatt

29

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:Artificially

## Synthesized Primer Sequence

&lt;400&gt; 6

atgcggcgc tcagtttcgg aggtaacctg

30

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

gcaccgtac aaaggaaaag aagaaata

28

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

ttgcggccgc tatgactgtg gtaccttat

29

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

ctgtcgaaat ccacgagggg aagaa

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

ttcttcccct cgtggatttc gacag

25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

tttcccttct cgtgacttga aagat

25

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

atctttcaag tcacgagaag ggaaa

25

<210> 13

<211> 2013

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (23)..(1999)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:GFP gene fused with HBsAg L protein gene

<400> 13

ctcgagggtcg agtataaaaa ca atg aga tct ttg ttg atc ttg gtt ttg tgt 52

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys

1

5

10

ttc ttg cca ttg gct gct ttg ggt aag gtt cga caa ggc atg ggg acg 100

Phe Leu Pro Leu Ala Ala Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr

15

20

25

aat ctt tct gtt ccc aat cct ctg gga ttc ttt ccc gat cac cag ttg 148

Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu

30

35

40

gac cct gcg ttc gga gcc aac tca aac aat cca gat tgg gac ttc aac 196

Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn

9/56

45

50

55

ccc aac aag gat caa tgg cca gag gca aat cag gta gga gcg gga gca 244

Pro Asn Lys Asp Gln Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala

60

65

70

ttc ggg cca ggg ttc acc cca cca cac ggc ggt ctt ttg ggg tgg agc 292

Phe Gly Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser

75

80

85

90

cct cag gct cag ggc ata ttg aca aca gtg cca gca gca cct cct cct 340

Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro

95

100

105

gcc tcc acc aat cgg cag tca gga aga cag cct act ccc atc tct cca 388

Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro

110

115

120

cct cta aga gac agt cat cct cag gcc atg cag tgg aat tcc aca aca 436

Pro Leu Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr

125

130

135

ttc cac caa gct ctg cta gat ccc aga gtg agg ggc cta tat ttt cct 484

Phe His Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro

140

145

150

10/56

gct ggt ggc tcc agt tcc gga aca gta aac cct gtt ccg act act gcc 532

Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala

155

160

165

170

tca ccc ata tct ggg gac cct gca ccg aac atg gag aac aca aca tca 580

Ser Pro Ile Ser Gly Asp Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser

175

180

185

gga ttc cta gga ccc ctg ctc gtg tta cag gcg ggg ttt ttc ttg ttg 628

Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu

190

195

200

aca aga atc ctc aca ata cca cag agt cta gac tcg tgg tgg act tct 676

Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser

205

210

215

ctc aat ttt cta ggg gga gca ccc acg tgt cct ggc caa aat tcg cag 724

Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln

220

225

230

tcc cca acc tcc aat cac tca cca acc tct tgt cct cca att tgt cct 772

Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro

235

240

245

250

11/56

ggc tat cgc tgg atg tgt ctg cgg cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc 820

Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile

255

260

265

ctg ctg cta tgc ctc atc ttc ttg ttg gtt ctt ctg gac tac caa ggt 868

Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly

270

275

280

atg ttg ccc gtt tgt cct cta ctt cca gga aca tca acc acc agc acg 916

Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr

285

290

295

ggg cca tgc aag acc tgc acg att cct gct caa gga acc tct atg ttt 964

Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe

300

305

310

ccc tct tgt tgc tgt aca aaa cct tcg gac gga aac tgc act tgt att 1012

Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile

315

320

325

330

ccc atc cca tca tcc tgg gct ttc gca aga ttc cta tgg gag tgg gcc 1060

Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala

335

340

345

tca gtc cgt ttc tcc tgg ctc agt tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg 1108

12/56

Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp

350

355

360

ttc gta ggg ctt tcc ccc act gtt tgg ctt tca gtt ata tgg atg atg 1156

Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met

365

370

375

tgg tat tgg ggg cca agt ctg tac aac atc ttg agt ccc ttt tta cct 1204

Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro

380

385

390

cta tta cca att ttc ttt tgt ctt tgg gta tat att gat tac aag gat 1252

Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile Asp Tyr Lys Asp

395

400

405

410

gac gac gat aag ata ccg gtc gcc acc atg gtg agc aag ggc gag gag 1300

Asp Asp Asp Lys Ile Pro Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu

415

420

425

ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta 1348

Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val

430

435

440

aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc 1396

Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr

13/56

445 450 455

tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc 1444  
Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro

460 465 470

gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ctg acc tac ggc gtg cag tgc 1492  
Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys

475 480 485 490

ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc 1540  
Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser

495 500 505

gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac 1588  
Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp

510 515 520

gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc 1636  
Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr

525 530 535

ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag gag gac ggc 1684  
Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly

540 545 550

14/56

aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac aac agc cac aac gtc 1732  
Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val  
555 560 565 570

tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg aac ttc aag 1780  
Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys  
575 580 585

atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac 1828  
Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr  
590 595 600

cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac 1876  
Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn  
605 610 615

cac tac ctg agc acc cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag 1924  
His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys  
620 625 630

cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act 1972  
Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr  
635 640 645 650



ctc ggc atg gac gag ctg tac aag taa agcggcccct cgag

2013

Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys

655

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 658

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:GFP protein fused with HBsAg L  
protein

&lt;400&gt; 14

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala

1 5 10 15

Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn

20 25 30

Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala

35 40 45

Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Gln Trp

50 55 60

Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly Pro Gly Phe Thr

65 70 75 80

Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile

16/56

85	90	95	
Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln			
100	105	110	
Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Ser His			
115	120	125	
Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu			
130	135	140	
Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser			
145	150	155	160
Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Gly Asp			
165	170	175	
Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu			
180	185	190	
Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile			
195	200	205	
Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly			
210	215	220	
Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His			
225	230	235	240
Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys			
245	250	255	
Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile			
260	265	270	
Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro			
275	280	285	

17/56

Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys  
290 295 300

Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr  
305 310 315 320

Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp  
325 330 335

Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp  
340 345 350

Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro  
355 360 365

Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser  
370 375 380

Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe  
385 390 395 400

Cys Leu Trp Val Tyr Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ile Pro  
405 410 415

Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val  
420 425 430

Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser  
435 440 445

Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu  
450 455 460

Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu  
465 470 475 480

Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp

18/56

485	490	495
His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr		
500	505	510
Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr		
515	520	525
Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu		
530	535	540
Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys		
545	550	555
Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys		560
565	570	575
Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu		
580	585	590
Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile		
595	600	605
Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln		
610	615	620
Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu		
625	630	635
Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu		640
645	650	655
Tyr Lys		

19/56

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 1803

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (23)..(1795)

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: IFN $\omega$  gene fused with HBsAg L p  
rotein gene

&lt;400&gt; 15

ctcgagggtcg agtataaaaa ca atg aga tct ttg ttg atc ttg gtt ttg tgt 52

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys

1

5

10

ttc ttg cca ttg gct gct ttg ggt aag gtt cga caa ggc atg ggg acg 100

Phe Leu Pro Leu Ala Ala Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr

15

20

25

aat ctt tct gtt ccc aat cct ctg gga ttc ttt ccc gat cac cag ttg 148

Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu

20/56

30

35

40

gac cct gcg ttc gga gcc aac tca aac aat cca gat tgg gac ttc aac 196

Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn

45

50

55

ccc aac aag gat caa tgg cca gag gca aat cag gta gga gcg gga gca 244

Pro Asn Lys Asp Gln Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala

60

65

70

ttc ggg cca ggg ttc acc cca cca cac ggc ggt ctt ttg ggg tgg agc 292

Phe Gly Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser

75

80

85

90

cct cag gct cag ggc ata ttg aca aca gtg cca gca gca cct cct cct 340

Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro

95

100

105

gcc tcc acc aat cgg cag tca gga aga cag cct act ccc atc tct cca 388

Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro

110

115

120

cct cta aga gac agt cat cct cag gcc atg cag tgg aat tcc aca aca 436

Pro Leu Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr

125

130

135

21/56

ttc cac caa gct ctg cta gat ccc aga gtg agg ggc cta tat ttt cct 484

Phe His Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro

140

145

150

gct ggt ggc tcc agt tcc gga aca gta aac cct gtt ccg act act gcc 532

Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala

155

160

165

170

tca ccc ata tct ggg gac cct gca ccg aac atg gag aac aca aca tca 580

Ser Pro Ile Ser Gly Asp Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser

175

180

185

gga ttc cta gga ccc ctg ctc gtg tta cag gcg ggg ttt ttc ttg ttg 628

Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu

190

195

200

aca aga atc ctc aca ata cca cag agt cta gac tcg tgg tgg act tct 676

Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser

205

210

215

ctc aat ttt cta ggg gga gca ccc acg tgt cct ggc caa aat tcg cag 724

Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln

220

225

230

22/56

tcc cca acc tcc aat cac tca cca acc tct tgt cct cca att tgt cct 772

Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro

235

240

245

250

ggc tat cgc tgg atg tgt ctg cgg cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc 820

Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile

255

260

265

ctg ctg cta tgc ctc atc ttc ttg ttg gtt ctt ctg gac tac caa ggt 868

Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly

270

275

280

atg ttg ccc gtt tgt cct cta ctt cca gga aca tca acc acc agc acg 916

Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr

285

290

295

ggg cca tgc aag acc tgc acg att cct gct caa gga acc tct atg ttt 964

Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe

300

305

310

ccc tct tgt tgc tgt aca aaa cct tcg gac gga aac tgc act tgt att 1012

Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile

315

320

325

330

ccc atc cca tca tcc tgg gct ttc gca aga ttc cta tgg gag tgg gcc 1060



23/56

Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala

335

340

345

tca gtc cgt ttc tcc tgg ctc agt tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg 1108

Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp

350

355

360

ttc gta ggg ctt tcc ccc act gtt tgg ctt tca gtt ata tgg atg atg 1156

Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met

365

370

375

tgg tat tgg ggg cca agt ctg tac aac atc ttg agt ccc ttt tta cct 1204

Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro

380

385

390

cta tta cca att ttc ttt tgt ctt tgg gta tat att gat tac aag gat 1252

Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile Asp Tyr Lys Asp

395

400

405

410

gac gac gat aag ata ccg gtg ggc tgt gat ctg cct cag aac cat ggc 1300

Asp Asp Asp Lys Ile Pro Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Asn His Gly

415

420

425

cta ctt agc agg aac acc ttg gtg ctt ctg cac caa atg agg aga atc 1348

Leu Leu Ser Arg Asn Thr Leu Val Leu Leu His Gln Met Arg Arg Ile

24/56

430

435

440

tcc cct ttc ttg tgt ctc aag gac aga aga gac ttc agg ttc ccc cag 1396

Ser Pro Phe Leu Cys Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Arg Phe Pro Gln

445

450

455

gag atg gta aaa ggg agc cag ttg cag aag gcc cat gtc atg tct gtc 1444

Glu Met Val Lys Gly Ser Gln Leu Gln Lys Ala His Val Met Ser Val

460

465

470

ctc cat gag atg ctg cag cag atc ttc agc ctc ttc cac aca gag cgc 1492

Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ile Phe Ser Leu Phe His Thr Glu Arg

475

480

485

490

tcc tct gct gcc tgg aac atg acc ctc cta gac caa ctc cac act gga 1540

Ser Ser Ala Ala Trp Asn Met Thr Leu Leu Asp Gln Leu His Thr Gly

495

500

505

ctt cat cag caa ctg caa cac ctg gag acc tgc ttg ctg cag gta gtg 1588

Leu His Gln Gln Leu Gln His Leu Glu Thr Cys Leu Leu Gln Val Val

510

515

520

gga gaa gga gaa tct gct ggg gca att agc agc cct gca ctg acc ttg 1636

Gly Glu Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ile Ser Ser Pro Ala Leu Thr Leu

525

530

535

agg agg tac ttc cag gga atc cgt gtc tac ctg aaa gag aag aaa tac 1684

Arg Arg Tyr Phe Gln Gly Ile Arg Val Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr

540

545

550

agc gac tgt gcc tgg gaa gtt gtc aga atg gaa atc atg aaa tcc ttg 1732

Ser Asp Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Met Glu Ile Met Lys Ser Leu

555

560

565

570

ttc tta tca aca aac atg caa gaa aga ctg aga agt aaa gat aga gac 1780

Phe Leu Ser Thr Asn Met Gln Glu Arg Leu Arg Ser Lys Asp Arg Asp

575

580

585

ctg ggc tca tct tga gcggccgc

1803

Leu Gly Ser Ser

590

<210> 16

<211> 590

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: IFN $\omega$  protein fused with HBsAg

L protein

26/56

&lt;400&gt; 16

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala  
1 5 10 15  
Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn  
20 25 30  
Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala  
35 40 45  
Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Gln Trp  
50 55 60  
Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly Pro Gly Phe Thr  
65 70 75 80  
Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile  
85 90 95  
Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln  
100 105 110  
Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Ser His  
115 120 125  
Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu  
130 135 140  
Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser  
145 150 155 160  
Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Gly Asp  
165 170 175  
Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu  
180 185 190

27/56

Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile  
195 200 205

Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly  
210 215 220

Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His  
225 230 235 240

Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys  
245 250 255

Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile  
260 265 270

Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro  
275 280 285

Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys  
290 295 300

Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr  
305 310 315 320

Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp  
325 330 335

Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp  
340 345 350

Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro  
355 360 365

Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser  
370 375 380

Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe



29/56

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 1779

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (23)..(1771)

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: IFN $\beta$  gene fused with HBsAg L p  
rotein gene

&lt;400&gt; 17

ctcgaggtcg agtataaaaa ca atg aga tct ttg ttg atc ttg gtt ttg tgt 52

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys

1

5

10

ttc ttg cca ttg gct gct ttg ggt aag gtt cga caa ggc atg ggg acg 100

Phe Leu Pro Leu Ala Ala Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr

15

20

25

30/56

aat ctt tct gtt ccc aat cct ctg gga ttc ttt ccc gat cac cag ttg 148  
Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu  
30 35 40

gac cct gcg ttc gga gcc aac tca aac aat cca gat tgg gac ttc aac 196  
Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn  
45 50 55

ccc aac aag gat caa tgg cca gag gca aat cag gta gga gcg gga gca 244  
Pro Asn Lys Asp Gln Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala  
60 65 70

ttc ggg cca ggg ttc acc cca cca cac ggc ggt ctt ttg ggg tgg agc 292  
Phe Gly Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser  
75 80 85 90

cct cag gct cag ggc ata ttg aca aca gtg cca gca gca cct cct cct 340  
Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro  
95 100 105

gcc tcc acc aat cgg cag tca gga aga cag cct act ccc atc tct cca 388  
Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro  
110 115 120

cct cta aga gac agt cat cct cag gcc atg cag tgg aat tcc aca aca 436



31/56

Pro Leu Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr

125

130

135

ttc cac caa gct ctg cta gat ccc aga gtg agg ggc cta tat ttt cct 484

Phe His Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro

140

145

150

gct ggt ggc tcc agt tcc gga aca gta aac cct gtt ccg act act gcc 532

Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala

155

160

165

170

tca ccc ata tct ggg gac cct gca ccg aac atg gag aac aca aca tca 580

Ser Pro Ile Ser Gly Asp Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser

175

180

185

gga ttc cta gga ccc ctg ctc gtg tta cag gcg ggg ttt ttc ttg ttg 628

Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu

190

195

200

aca aga atc ctc aca ata cca cag agt cta gac tcg tgg tgg act tct 676

Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser

205

210

215

ctc aat ttt cta ggg gga gca ccc acg tgt cct ggc caa aat tcg cag 724

Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln

32/56

220	225	230	
tcc cca acc tcc aat cac tca cca acc tct tgt cct cca att tgt cct 772			
Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro			
235	240	245	250
ggc tat cgc tgg atg tgt ctg cgg cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc 820			
Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile			
	255	260	265
ctg ctg cta tgc ctc atc ttc ttg ttg gtt ctt ctg gac tac caa ggt 868			
Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly			
	270	275	280
atg ttg ccc gtt tgt cct cta ctt cca gga aca tca acc acc agc acg 916			
Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr			
	285	290	295
ggg cca tgc aag acc tgc acg att cct gct caa gga acc tct atg ttt 964			
Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe			
300	305	310	
ccc tct tgt tgc tgt aca aaa cct tcg gac gga aac tgc act tgt att 1012			
Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile			
315	320	325	330

ccc atc cca tca tcc tgg gct ttc gca aga ttc cta tgg gag tgg gcc 1060

Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala

335

340

345

tca gtc cgt ttc tcc tgg ctc agt tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg 1108

Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp

350

355

360

ttc gta ggg ctt tcc ccc act gtt tgg ctt tca gtt ata tgg atg atg 1156

Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met

365

370

375

tgg tat tgg ggg cca agt ctg tac aac atc ttg agt ccc ttt tta cct 1204

Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro

380

385

390

cta tta cca att ttc ttt tgt ctt tgg gta tat att gat tac aag gat 1252

Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile Asp Tyr Lys Asp

395

400

405

410

gac gac gat aag ata ccg gtg agc tac aac ttg ctt gga ttc cta caa 1300

Asp Asp Asp Lys Ile Pro Val Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln

415

420

425

34/56

aga agc agc aat ttt cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg aat ggg 1348

Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly

430

435

440

agg ctt gaa tac tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac atc cct gag 1396

Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu

445

450

455

gag att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc 1444

Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr

460

465

470

atc tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca 1492

Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser

475

480

485

490

tct agc act ggc tgg aat gag act att gtt gag aac ctc ctg gct aat 1540

Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn

495

500

505

gtc tat cat cag ata aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg 1588

Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu

510

515

520

gag aaa gaa gat ttc acc agg gga aaa ctc atg agc agt ctg cac ctg 1636

35/56

Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu

525

530

535

aaa aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag gag tac 1684

Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr

540

545

550

agt cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg aac ttt 1732

Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe

555

560

565

570

tac ttc att aac aga ctt aca ggt tac ctc cga aac tga gcggcgc 1779

Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn

575

580

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 582

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: IFN $\beta$  protein fused with HBsAg  
L protein

36/56

&lt;400&gt; 18

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala  
1 5 10 15  
Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn  
20 25 30  
Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala  
35 40 45  
Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Gln Trp  
50 55 60  
Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly Pro Gly Phe Thr  
65 70 75 80  
Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile  
85 90 95  
Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln  
100 105 110  
Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Ser His  
115 120 125  
Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu  
130 135 140  
Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser  
145 150 155 160  
Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Gly Asp  
165 170 175  
Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu  
180 185 190

37/56

Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile  
195 200 205

Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly  
210 215 220

Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His  
225 230 235 240

Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys  
245 250 255

Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile  
260 265 270

Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro  
275 280 285

Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys  
290 295 300

Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr  
305 310 315 320

Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp  
325 330 335

Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp  
340 345 350

Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro  
355 360 365

Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser  
370 375 380

Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe

1

580



<210> 19

<211> 3359

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (23)..(3352)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HGF gene fused with HBsAg L protein gene

<400> 19

ctcgagggtcg agtataaaaa ca atg aga tct ttg ttg atc ttg gtt ttg tgt 52

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys

1 5 10

ttc ttg cca ttg gct gct ttg ggt aag gtt cga caa ggc atg ggg acg 100

Phe Leu Pro Leu Ala Ala Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr

15

20

25

aat ctt tct gtt ccc aat cct ctg gga ttc ttt ccc gat cac cag ttg 148  
Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu

30

35

40

gac cct gcg ttc gga gcc aac tca aac aat cca gat tgg gac ttc aac 196  
Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn

45

50

55

ccc aac aag gat caa tgg cca gag gca aat cag gta gga gcg gga gca 244  
Pro Asn Lys Asp Gln Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala

60

65

70

ttc ggg cca ggg ttc acc cca cca cac ggc ggt ctt ttg ggg tgg agc 292  
Phe Gly Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser

75

80

85

90

cct cag gct cag ggc ata ttg aca aca gtg cca gca gca cct cct cct 340  
Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro

95

100

105

gcc tcc acc aat cgg cag tca gga aga cag cct act ccc atc tct cca 388  
Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro

110

115

120

41/56

cct cta aga gac agt cat cct cag gcc atg cag tgg aat tcc aca aca 436

Pro Leu Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr

125

130

135

ttc cac caa gct ctg cta gat ccc aga gtg agg ggc cta tat ttt cct 484

Phe His Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro

140

145

150

gct ggt ggc tcc agt tcc gga aca gta aac cct gtt ccg act act gcc 532

Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala

155

160

165

170

tca ccc ata tct ggg gac cct gca ccg aac atg gag aac aca aca tca 580

Ser Pro Ile Ser Gly Asp Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser

175

180

185

gga ttc cta gga ccc ctg ctc gtg tta cag gcg ggg ttt ttc ttg ttg 628

Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu

190

195

200

aca aga atc ctc aca ata cca cag agt cta gac tcg tgg tgg act tct 676

Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser

205

210

215

ctc aat ttt cta ggg gga gca ccc acg tgt cct ggc caa aat tcg cag 724

42/56

Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln

220

225

230

tcc cca acc tcc aat cac tca cca acc tct tgt cct cca att tgt cct 772

Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro

235

240

245

250

ggc tat cgc tgg atg tgt ctg cgg cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc 820

Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile

255

260

265

ctg ctg cta tgc ctc atc ttc ttg ttg gtt ctt ctg gac tac caa ggt 868

Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly

270

275

280

atg ttg ccc gtt tgt cct cta ctt cca gga aca tca acc acc agc acg 916

Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr

285

290

295

ggg cca tgc aag acc tgc acg att cct gct caa gga acc tct atg ttt 964

Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe

300

305

310

ccc tct tgt tgc tgt aca aaa cct tcg gac gga aac tgc act tgt att 1012

Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile

43/56

315

320

325

330

ccc atc cca tca tcc tgg gct ttc gca aga ttc cta tgg gag tgg gcc 1060

Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala

335

340

345

tca gtc cgt ttc tcc tgg ctc agt tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg 1108

Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp

350

355

360

ttc gta ggg ctt tcc ccc act gtt tgg ctt tca gtt ata tgg atg atg 1156

Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met

365

370

375

tgg tat tgg ggg cca agt ctg tac aac atc ttg agt ccc ttt tta cct 1204

Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro

380

385

390

cta tta cca att ttc ttt tgt ctt tgg gta tat att gat tac aag gat 1252

Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile Asp Tyr Lys Asp

395

400

405

410

gac gac gat aag ata ccg gta caa agg aaa aga aga aat aca att cat 1300

Asp Asp Asp Lys Ile Pro Val Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His

415

420

425

gaa ttc aaa aaa tca gca aag act acc cta atc aaa ata gat cca gca 1348

Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala

430

435

440

ctg aag ata aaa acc aaa aaa gtg aat act gca gac caa tgt gct aat 1396

Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn

445

450

455

aga tgt act agg aat aaa gga ctt cca ttc act tgc aag gct ttt gtt 1444

Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val

460

465

470

ttt gat aaa gca aga aaa caa tgc ctc tgg ttc ccc ttc aat agc atg 1492

Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met

475

480

485

490

tca agt gga gtg aaa aaa gaa ttt ggc cat gaa ttt gac ctc tat gaa 1540

Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu

495

500

505

aac aaa gac tac att aga aac tgc atc att ggt aaa gga cgc agc tac 1588

Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr

510

515

520

45/56

aag gga aca gta tct atc act aag agt ggc atc aaa tgt cag ccc tgg 1636

Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp

525

530

535

agt tcc atg ata cca cac gaa cac agc tat cgg ggt aaa gac cta cag 1684

Ser Ser Met Ile Pro His Glu His Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln

540

545

550

gaa aac tac tgt cga aat cca cga ggg gaa gaa ggg gga ccc tgg tgt 1732

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys

555

560

565

570

ttc aca agc aat cca gag gta cgc tac gaa gtc tgt gac att cct cag 1780

Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln

575

580

585

tgt tca gaa gtt gaa tgc atg acc tgc aat ggg gag agt tat cga ggt 1828

Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly

590

595

600

ctc atg gat cat aca gaa tca ggc aag att tgt cag cgc tgg gat cat 1876

Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His

605

610

615

cag aca cca cac cgg cac aaa ttc ttg cct gaa aga tat ccc gac aag 1924

46/56

Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys

620

625

630

ggc ttt gat gat aat tat tgc cgc aat ccc gat ggc cag ccg agg cca 1972

Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro

635

640

645

650

tgg tgc tat act ctt gac cct cac acc cgc tgg gag tac tgt gca att 2020

Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile

655

660

665

aaa aca tgc gct gac aat act atg aat gac act gat gtt cct ttg gaa 2068

Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu

670

675

680

aca act gaa tgc atc caa ggt caa gga gaa ggc tac agg ggc act gtc 2116

Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val

685

690

695

aat acc att tgg aat gga att cca tgt cag cgt tgg gat tct cag tat 2164

Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr

700

705

710

cct cac gag cat gac atg act cct gaa aat ttc aag tgc aag gac cta 2212

Pro His Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu



47/56

715

720

725

730

cga gaa aat tac tgc cga aat cca gat ggg tct gaa tca ccc tgg tgt 2260

Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys

735

740

745

ttt acc act gat cca aac atc cga gtt ggc tac tgc tcc caa att cca 2308

Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro

750

755

760

aac tgt gat atg tca cat gga caa gat tgt tat cgt ggg aat ggc aaa 2356

Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys

765

770

775

aat tat atg ggc aac tta tcc caa aca aga tct gga cta aca tgt tca 2404

Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser

780

785

790

atg tgg gac aag aac atg gaa gac tta cat cgt cat atc ttc tgg gaa 2452

Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu

795

800

805

810

cca gat gca agt aag ctg aat gag aat tac tgc cga aat cca gat gat 2500

Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp

815

820

825

gat gct cat gga ccc tgg tgc tac acg gga aat cca ctc att cct tgg 2548

Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp

830

835

840

gat tat tgc cct att tct cgt tgt gaa ggt gat acc aca cct aca ata 2596

Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile

845

850

855

gtc aat tta gac cat ccc gta ata tct tgt gcc aaa acg aaa caa ttg 2644

Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu

860

865

870

cga gti gta aat ggg att cca aca cga aca aac ata gga tgg atg gtt 2692

Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val

875

880

885

890

agt ttg aga tac aga aat aaa cat atc tgc gga gga tca ttg ata aag 2740

Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys

895

900

905

gag agt tgg gtt ctt act gca cga cag tgt ttc cct tct cgt gac ttg 2788

Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu

910

915

920

49/56

aaa gat tat gaa gct tgg ctt gga att cat gat gtc cac gga aga gga 2836

Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly

925

930

935

gat gag aaa tgc aaa cag gtt ctc aat gtt tcc cag ctg gta tat ggc 2884

Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly

940

945

950

cct gaa gga tca gat ctg gtt tta atg aag ctt gcc agg cct gct gtc 2932

Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val

955

960

965

970

ctg gat gat ttt gtt agt acg att gat tta cct aat tat gga tgc aca 2980

Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr

975

980

985

att cct gaa aag acc agt tgc agt gtt tat ggc tgg ggc tac act gga 3028

Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly

990

995

1000

ttg atc aac tat gat ggc cta tta cga gtg gca cat ctc tat ata atg 3076

Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met

1005

1010

1015

gga aat gag aaa tgc agc cag cat cat cga ggg aag gtg act ctg aat 3124

50/56

Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn

1020

1025

1030

gag tct gaa ata tgt gct ggg gct gaa aag att gga tca gga cca tgt 3172

Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys

1035

1040

1045

1050

gag ggg gat tat ggt ggc cca ctt gtt tgt gag caa cat aaa atg aga 3220

Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg

1055

1060

1065

atg gtt ctt ggt gtc att gtt cct ggt cgt gga tgt gcc att cca aat 3268

Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn

1070

1075

1080

cgt cct ggt att ttt gtc cga gta gca tat tat gca aaa tgg ata cac 3316

Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His

1085

1090

1095

aaa att att tta aca tat aag gta cca cag tca tag cggccgc 3359

Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val Pro Gln Ser

1100

1105

1110

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 1109

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:HGF protein fused with HBsAg L  
protein

&lt;400&gt; 20

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala

1 5 10 15

Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn

20 25 30

Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala

35 40 45

Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Gln Trp

50 55 60

Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly Pro Gly Phe Thr

65 70 75 80

Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile

85 90 95

Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln

100 105 110

Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Ser His

115 120 125

Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu

130 135 140  
Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser  
145 150 155 160  
Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Gly Asp  
165 170 175  
Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu  
180 185 190  
Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile  
195 200 205  
Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly  
210 215 220  
Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His  
225 230 235 240  
Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys  
245 250 255  
Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile  
260 265 270  
Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro  
275 280 285  
Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys  
290 295 300  
Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr  
305 310 315 320  
Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp  
325 330 335

53/56

Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp

340

345

350

Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro

355

360

365

Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser

370

375

380

Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe

385

390

395

400

Cys Leu Trp Val Tyr Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ile Pro

405

410

415

Val Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala

420

425

430

Lys Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys

435

440

445

Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys

450

455

460

Gly Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys

465

470

475

480

Gln Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys

485

490

495

Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg

500

505

510

Asn Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile

515

520

525

Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His

54/56

530	535	540	
Glu His Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn			
545	550	555	560
Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu			
	565	570	575
Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys			
	580	585	590
Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu			
	595	600	605
Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His			
	610	615	620
Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr			
625	630	635	640
Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp			
	645	650	655
Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn			
	660	665	670
Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln			
	675	680	685
Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly			
	690	695	700
Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met			
705	710	715	720
Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg			
	725	730	735



55/56

Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn

740

745

750

Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His

755

760

765

Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu

770

775

780

Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met

785

790

795

800

Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu

805

810

815

Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp

820

825

830

Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser

835

840

845

Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro

850

855

860

Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile

865

870

875

880

Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn

885

890

895

Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr

900

905

910

Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp

915

920

925

Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln

930 935 940  
Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu  
945 950 955 960  
Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser  
965 970 975  
Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser  
980 985 990  
Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly  
995 1000 1005  
Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser  
1010 1015 1020  
Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala  
1025 1030 1035 1040  
Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly  
1045 1050 1055  
Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile  
1060 1065 1070  
Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val  
1075 1080 1085  
Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr  
1090 1095 1100  
Lys Val Pro Gln Ser  
1105

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02602

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, A61K45/00, A61K9/51, A61K9/08, A61K38/18,  
A61K38/21, A61P1/16, A61P35/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K48/00, A61K45/00, A61K9/51, A61K9/08, A61K38/18,  
A61K38/21, A61P1/16, A61P35/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), BIOSIS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), WPI

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Masaru MURAOKA et al., "Drug Delivery o Mezashita Tokui-sei Kaihen-gata B-gata Haien Hyomen Kogen Chuku Nano Ryushi no Kaihatsu", Kagaku Kogakkai Nenkai Kenkyu Happyo Koen Yoshishu, 23 February, 2003 (23.02.03), 68th page 443, L304	1-6
P, A	Shun'ichi KURODA et al., "Bionano Ryushi o Mochiiru Atarashii Idenshi Donyu-ho no Kaihatsu to Sentan Iryo eno Oyo", Materials Integration, July, 2002, Vol.15, No.7, pages 12 to 17	1-6
Y	WO 01/64930 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORP.), 07 September, 2001 (07.09.01), & EP 1262555 A1 & JP 2001/316298 A	1-6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 06 June, 2003 (06.06.03)	Date of mailing of the international search report 24 June, 2003 (24.06.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02602

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Tadanori YAMADA et al., "B-gata Haien Virus Hyomen Kogen Nano Ryushi o Mochiita Atarashii Idenshi Donyu-ho no Kaihatsu", Kagaku Kogakkai Nenkai Kenkyu Happyo Koen Yoshishu, 02 March, 2001 (02.03.01), 66th, page 271, F307	1-6
Y	DELPEYROUX, F. et al., "Insertion in the hepatitis B surface antigen. Effect on assembly and secretion of 22-nm particles from mammalian cells", J.Mol. Biol., 1987, Vol.195, No.2, pages 343 to 350	1-6
Y	EP 201416 A1 (INST PASTEUR), 12 November, 1986 (12.11.86), & FR 2581394 A1 & JP 61-258000 A & DE 3678609 A1 & JP 8-198897 A	1-6
Y	VALENZUELA, P. et al., "Antigen engineering in yeast: synthesis and assembly of hybrid hepatitis B surface antigen-herpes simplex 1 gD particles.", Bio/Technology, 1985, Vol.3, No.4, pages 323 to 326	1-6
A	AMMERER, G. et al., "Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast.", Nature, 1982, Vol.298, No.5872, pages 347 to 350	1-6
A	KURODA, S. et al., "Hepatitis B virus envelope L protein particles.", J.Biol.Chem., 1992, Vol.267, No.3, pages 1953 to 1961	1-6
A	PUMPENS, P. et al., "Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development.", FEBS Letters, 1999, Vol.442, pages 1 to 6	1-6
A	HANENBERG, H. et al., "Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells.", Nat.Med., 1996, Vol.2, No.8, pages 876 to 882	1-6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/02602

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 8 involves method for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> A61K48/00, A61K45/00, A61K9/51, A61K9/08, A61K38/18, A61K38/21, A61P1/16, A61P35/00

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>1</sup> A61K48/00, A61K45/00, A61K9/51, A61K9/08, A61K38/18, A61K38/21, A61P1/16, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS(STN), BIOSIS(STN), MEDLINE(STN), EMBASE(STN), WPI

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	村岡優他, 'ドラッグデリバリーを目指した特異性改変型B型肝炎表面抗原中空ナノ粒子の開発' 化学工学会年会研究発表講演要旨集, 2003.02.23, 68th, p.443 L304	1-6
P, A	黒田俊一他, 'バイオナノ粒子を用いる新しい遺伝子導入法の開発と先端医療への応用' Materials Integration, Jul.2002, vol.15, no.7, p.12-17	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

06.06.03

国際調査報告の発送日

24.06.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大久保元浩

4C

8828

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 01/64930 A1 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORP) 2001. 09. 07 & EP 1262555 A1 & JP 2001-316298 A	1-6
Y	山田忠範他, 'B型肝炎ウイルス表面抗原ナノ粒子を用いた新しい 遺伝子導入法の開発' 化学工学会年会研究発表講演要旨集, 200 1. 03. 02, 66th, p. 271 F307	1-6
Y	DELPEYROUX, F. et al. 'Insertions in the hepatitis B surface antigen. Effect on assembly and secretion of 22-nm particle s from mammalian cells.' J. Mol. Biol., 1987, vol. 195, no. 2, p. 343-350	1-6
Y	EP 201416 A1 (INST PASTEUR) 1986. 11. 12 & FR 2581394 A1 & JP 61-258000 A & DE 3678609 A1 & JP 8-198897 A	1-6
Y	VALENZUELA, P. et al. 'Antigen engineering in yeast: syntheses is and assembly of hybrid hepatitis B surface antigen-herpes simplex 1 gD particles.' Bio/Technology, 1985, vol. 3, no. 4, p. 323-326	1-6
A	AMMERER, G. et al. 'Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast.' Nature, 1982, vol. 2 98, no. 5872, p. 347-350	1-6
A	KURODA, S. et al. 'Hepatitis B virus envelope L protein particles. ' J. Biol. Chem., 1992, vol. 267, no. 3, p. 1953-1961	1-6



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	PUMPENS, P. et al. 'Hepatitis B core particles as a universal display model: a structure-function basis for development.' FEBS Letters, 1999, vol. 442, p. 1-6	1-6
A	HANENBERG, H. et al. 'Colocalization of retrovirus and target cells on specific fibronectin fragments increases genetic transduction of mammalian cells.' Nat. Med., 1996, vol. 2, no. 8, p. 876-882	1-6

## 第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、

請求の範囲8は、治療による人体の処置方法に関する態様を含むものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。